



Instituto Politécnico Nacional
Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía
Sección de Estudios de Posgrado e Investigación
Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Evaluación del mecanismo neuroprotector inducido por la activación de los PPARs

Tesis

Que para obtener el grado de
Doctora en Ciencias en Biotecnología

Presenta

M en C. Morales Martínez Adriana

Directores:

Dr. Absalom Zamorano Carrillo

Dra. Francisca Pérez Severiano



Ciudad de México, 2017



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 12:00 horas del día 05 del mes de Junio del 2017 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de para examinar la tesis titulada:

Evaluación del mecanismo neuroprotector inducido por la activación de los PPARs

Presentada por el alumno:

Morales	Martínez	Adriana
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)
		Con registro:
		B 1 3 1 1 6 9

aspirante de: Doctorado en Ciencias en Biotecnología

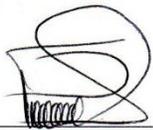
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis



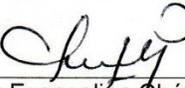
Dr. Absalom Zamorano Carrillo



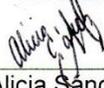
Dra. Francisca Pérez Severiano



Dra. Claudia Guadalupe Benítez
Cardoza



Dra. Aracely Evangelina Chávez Piña



Dra. María Alicia Sánchez Mendoza

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Escuela Nacional de Medicina
Y HOMEOPATÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN



Dra. Mónica Ascención De Nova Ocampo



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 22 del mes de Junio del año 2017, la que suscribe Adriana Morales Martínez alumna del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología, con número de registro B131169, adscrita a la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional, manifiesta que es la autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Absalom Zamorano Carrillo y de la Dra. Francisca Pérez Severiano y cede los derechos del trabajo titulado “Evaluación del mecanismo neuroprotector inducido por la activación de los PPARs”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso de la autora y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones adri.tika2@gmail.com o azamorano@ipn.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

M en C. Adriana Morales Martínez

Agradecimientos

Agradezco a mis asesores de tesis, el Dr. Absalom y la Dra. Francis por su guía, apoyo, tiempo, consejos y por su labor para desarrollar este proyecto. Aprecio enormemente su confianza.

Al comité tutorial por su apoyo y comentarios para la retroalimentación y enriquecimiento de este trabajo.

A los Doctores y alumnos que conforman el departamento de Neuroquímica del INNN "MVS"

A los Doctores y alumnos que conforman el laboratorio de Bioquímica y Biofísica Computacional en la ENMyH-IPN

Y finalmente a mi familia que es mi motivo y mi fuerza. Mis padres Raymundo y Reyna y mis hermanos Alfre, Isa (incluyendo a Emi) y Lupis, los amo y admiro.

Contenido

Resumen	10
Abstract.....	12
1. Introducción y Antecedentes.....	14
1.1 Función de los PPARs en el Sistema Nervioso Central (SNC)	16
1.2 Circuito motor de los ganglios basales en individuo sano e individuo con la EH	17
1.3 Disfunción y daño bioenergético mitocondrial en la EH	18
1.4 Modelos experimentales para la EH	20
1.4.1 Modelo Neuroquímico	21
1.4.2 Modelo Transgénico R6/1.....	21
1.5 Estudios de <i>docking</i>	22
1.6 Participación de las Isoformas de PPARs en la búsqueda de terapias para la EH	23
2. Justificación	26
3. Objetivos	27
3.1 Objetivo general	27
3.2 Objetivos específicos	27
4. Estrategia experimental	28
5. Material y Métodos	30
5.1 Protocolo 1	30
5.1.1 Pretratamientos.....	30
5.1.2 Modelo de excitotoxicidad inducido por la lesión estereotáxica con AQ.	30
5.1.3 Evaluación conductual	30
5.1.4 Medición de los niveles de GABA.	31
5.2 Protocolo 2	31
5.2.1 Modelo de excitotoxicidad inducido por la lesión estereotáxica con AQ	31
5.2.2 Cuantificación de la peroxidación de lípidos.....	32
5.2.3 Cuantificación de la EROs.	32
5.3 Protocolo 3	33
5.3.1 Estudios de Acoplamiento molecular (<i>Docking</i>)	33
5.4 Protocolo 4	33
5.4.1 Administración del tratamiento.....	34
5.4.2 Evaluación conductual en el modelo transgénico para la EH (línea R6/1)	34

5.4.3	Respiración mitocondrial	36
6.	Resultados.....	37
6.1	Resultados del Objetivo I.....	37
6.2	Resultados del Objetivo II.....	39
6.3	Resultados del objetivo III	41
6.3.1	Acoplamiento molecular (<i>Docking</i>)	41
6.4	Interpretación de resultados conjuntos de los modelos neuroquímico (<i>in vivo</i>) e <i>in silico</i> 56	
6.5	Resultados del objetivo IV	58
6.6	Resultados del objetivo V	63
7.	Discusión	66
7.1	Propuesta de un mecanismo neuroprotector en los parámetros conductuales en el modelo neuroquímico.....	67
7.2	Hallazgos en los estudios <i>in silico</i> en las interacciones con agonistas PPARs	69
7.3	Fortalecimiento de una hipótesis: hallazgos conjuntos de modelos neuroquímico e <i>in silico</i> 70	
7.4	Búsqueda del mecanismo protector del agonista PPAR β/δ en el modelo transgénico	70
7.5	Modelo transgénico R6/1 y la respuesta mitocondrial ante el pretratamiento con el agonista PPAR β/δ	72
8.	Conclusiones.....	75
9.	Referencias	76

Lista de figuras

Figura 1. Mecanismo de activación de PPARs.....	
Figura 2. Circuito motor de los ganglios basales.....	
Figura 3. Disfunción mitocondrial en la EH.....	
Figura 4. Evaluación de la conducta rotatoria después de la administración de tratamientos y la lesión con AQ	
Figura 5. Medición de los niveles de GABA	
Figura 6. Evaluación de peroxidación de lípidos en estriado de ratones pretratados y lesionados con AQ.	
Figura 7. Cuantificación de EROs en estriado de ratones pretratados y lesionados con AQ.....	
Figura 8. Validación del método, PPAR γ con DHA después del docking.....	
Figura 9. Interacciones entre el PPAR γ con EPA después del docking	
Figura 10. Interacciones entre el PPAR γ con AO después del docking.	
Figura 11. Interacciones entre el PPAR γ con Rosiglitazona después del docking	
Figura 12. Interacciones entre el PPAR γ con Pioglitazona después del docking.	
Figura 13. Interacciones entre el PPAR γ con GW1929 después del docking	
Figura 14. Interacciones entre el PPAR β/δ con GW501516 después del docking. ...	
Figura 15. Interacciones entre el PPAR β/δ con L-165041 después del docking.....	
Figura 16. Diagrama de la triada de PPARs.....	
Figura 17. Actividad motora espontanea de 11, 24 y 35 semanas de edad.....	
Figura 18. Actividad locomotora de 11, 24 y 35 semanas de edad.	

Figura 19. Evaluación del estrés oxidante en ratones transgénicos R6/1 y Wild type de 11, 24 y 35 semanas de edad.....

Figura 20. Consumo de oxígeno de complejo I y II de la cadena de respiración R6/1 de 11, 24 y 35 semanas de edad.....

Figura 21. Consumo de oxígeno de complejo II de la cadena de respiración R6/1 de 11, 24 y 35 semanas de edad.....

Figura 22. Activación de PPARs promueve la vía BDNF-TrkB.....

Figura 23. Sitio de unión al ligando de PPARs.....

Lista de cuadros

- Cuadro 1. Función y localización de las isoformas de PPAR.
- Cuadro 2. Los grupos experimentales formados para el modelo transgénico R6/1...
- Cuadro 3. Propiedades de los modelos de interacción de PPAR- γ + DHA.....
- Cuadro 4. Propiedades de los modelos de interacción de PPAR- γ + EPA.
- Cuadro 5. Propiedades de los modelos de interacción PPAR- γ + AO.
- Cuadro 6. Propiedades de los modelos de interacción de PPAR- γ + Rosiglitazona..
- Cuadro 7. Propiedades de los modelos de interacción de PPAR- γ + Pioglitazona
- Cuadro 8. Propiedades de los modelos de interacción de PPAR- γ + GW1929.
- Cuadro 9. Propiedades de los modelos de interacción de PPAR β/δ + GW501516...
- Cuadro 10. Propiedades de los modelos de interacción de PPAR β/δ + L-165041....
- Cuadro 11. . Interacciones y ΔG de afinidad de los agonistas para PPARs
- Cuadro 12. Comparación cualitativa de los efectos conductuales y bioquímicos estudiados bajo el tratamiento de los agonistas PPARs.....
- Cuadro 13. Comparación cualitativa de los efectos conductuales y bioquímicos estudiados considerando las isoformas de PPARs como blanco farmacológico.
- Cuadro 14. Evaluación del “*feet clasping*” de animales transgénicos y Wild Type tratados con L-165041 a 11, 24, 35 semanas de edad.....

Resumen

Los PPARs (del inglés Peroxisome Proliferator Activated Receptors) son miembros de la familia de receptores nucleares activados por ligandos endógenos (ácidos grasos) y exógenos (fibratos, tiazolidinedionas). Existen tres isoformas de PPARs (PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ) estudiadas como blancos terapéuticos en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington (EH). PPAR β/δ y PPAR γ son expresados altamente en cerebro, de los cuales su mecanismo de protección y su efectividad terapéutica, no están claramente descritos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la efectividad terapéutica de agonistas de PPAR β/δ y PPAR γ , y dilucidar el mecanismo neuroprotector del agonista con mayor efectividad. Se emplearon dos modelos experimentales en ratones que mimetizan a la EH: el modelo neuroquímico, inducido por un agonista del receptor NMDA (ácido quinolínico; AQ) y el modelo transgénico R/61, el cual contiene la mutación de la huntingtina (HTT) humana con 116 repetidos del trinucleótido CAG. Fueron administrados los agonistas de PPARs: GW501516, L165041, GW1929, Pioglitazona, Ácido oleico (AO) y Ácido Eicosapentaenoico (EPA), como pretratamiento en el modelo neuroquímico con AQ. Se evaluó la conducta rotatoria, se cuantificó el nivel del ácido Gama Aminobutírico (GABA) y el estrés oxidante estriatal. Paralelamente se realizaron estudios de acoplamiento *in silico* entre los receptores PPAR β/δ y PPAR γ con los agonistas probados *in vivo*. *In silico* se obtuvo el ΔG de afinidad y las interacciones formadas. Ambos estudios en conjunto brindaron información del efecto neuroprotector y la estabilidad de la unión del receptor a su ligando, donde el mayor efecto neuroprotector *in vivo* fue de L-165041, AO y EPA. En el estudio *in silico* el mejor ΔG fue de GW1929, agonista específico para la isoforma de PPAR γ , observándose interacciones con cuatro aminoácidos importantes del receptor (Ser289, His323, His449, y Tyr473). En la segunda parte del estudio, se emplearon los ratones de la línea R6/1 de 11, 24 y 35 semanas de edad a los cuales se les administró el agonista específico para PPAR β/δ , L-165041 (con mayor efecto neuroprotector). Se evaluó la conducta motora, se cuantificó el estrés oxidante y la respiración mitocondrial, obteniendo como hallazgo principal que a la edad temprana de 11 semanas, el pretratamiento con el agonista PPAR β/δ L-165041 es idóneo para ejercer un ambiente neuroprotector en la respiración mitocondrial y en la prevención de daño conductual y oxidante en las edades de 11, 24 y 35 semanas. En conclusión, la estimulación de PPARs por ligandos endógenos y exógenos podría ser un recurso terapéutico para limitar la progresión de desórdenes neurodegenerativos como la EH siguiendo vías antioxidantes y

posiblemente incluyendo la vía BDNF-TrkB. Paralelamente, en este estudio consideramos la importancia de discernir entre agonistas específicos para PPARs con más eficacia, y de determinar el efecto en que un agonista en particular es más efectivo.

Abstract

Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) are members of the nuclear receptor superfamily that can be activated by endogenous (fatty acids) or exogenous (thiazolidinediones, fibrates) ligands. There are three isoforms of PPARs (alpha, beta/delta, and gamma); their distribution and function are isoform specific. PPAR beta/delta and gamma are highly expressed in the brain, and their activation has been related to a neuroprotector effect. Our group has employed selective PPAR ligands in Huntington disease (HD) experimental models that show an increasing in antioxidant defense. However, a wider description of the mechanisms and the therapeutic effectiveness of the agonists are necessary. Therefore, the aim of the present dissertation was to explore the PPARs-induced antioxidant mechanism and to evaluate the therapeutic effectiveness of PPARs ligands preventing the oxidative damage in HD models. The two experimental models employed were a neurochemical using a scheme of quinolinic acid (QUIN)-induced injury, via the neurotoxicity of the NMDAr (N-methyl-D-Aspartate receptor); and a genetic, using the R6/1 transgenic mice, that express exon 1 of HTT with 116 repeated of CAG. Mice were administered with the following PPAR agonists: GW501516, L-165041, GW1929, Pioglitazone, Oleic Acid (OA), and Eicosapentaenoic Acid (EPA), as a pretreatment before inducing neuronal death by QUIN. After, we measured circling behavior, oxidative damage, and GABA levels in the striatum. Docking in silico of PPAR β/δ y PPAR γ with agonists were also performed giving ΔG and the geometry of the interactions. Both studies, in vivo and in silico provide information about the neuroprotector effect and the binding stability between receptor with ligands. GW501516, L-165041, GW1929, Pioglitazone, OA, and EPA were able to reduce circling behavior and oxidative stress. However, L165041, OA, and EPA were the most effective. Mice pre-treated recovered QUIN-induced lowered GABA levels. GW1929 presented the highest ΔG , and the agonist interacts with four critical residues (Ser289, His323, His449, and Tyr473). In the second part of the study, the R6/1 transgenic mice of 11, 24, and 35 weeks were administered with L-165041 (PPAR β/δ specific), the agonist showing the largest neuroprotector effect observed in the experiments with QUIN. Later, we assess motor behavior, oxidative stress, and mitochondrial respiration. Our data demonstrated a positive effect on motor behavior and mitochondrial respiration at an early age (eleven weeks), and oxidative damage was diminished in the three ages assessed. In conclusion, the stimulation of PPARs by ligands could be a therapeutic resource to limit the neurodegenerative process as it occurs in the HD. The mechanism of action of these

PPARs-agonists might follow the antioxidant and the BDNF-TrkB pathways creating an environment favorable to prevent the neurodegeneration. Moreover, this work focuses on the importance of distinguishing specific agonists for PPARs and which parameter is more adequate to evaluate its effectivity.

1. Introducción y Antecedentes

Los receptores (PPAR's; del inglés Peroxisome Proliferator Activated Receptors), son un grupo de proteínas nucleares activadas por ligandos que regulan la expresión de genes diana por unión a elementos de respuesta de proliferación peroxisomal específicos (PPREs) (Berger & Moller, 2002). Cada receptor se une a su PPRE una vez que ha formado un heterodímero con el Receptor X Retinoide (RXR) (ver figura 1) (Zoete, Grosdidier, & Michielin, 2007). En general desarrollan un papel importante en el metabolismo energético; participando en la regulación de lípidos, glucosa y aminoácidos (Tyagi, Gupta, & Saini, 2011). De los PPARs se conocen tres isoformas PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ , los cuales pueden ser activados por diferentes ligandos endógenos o exógenos.

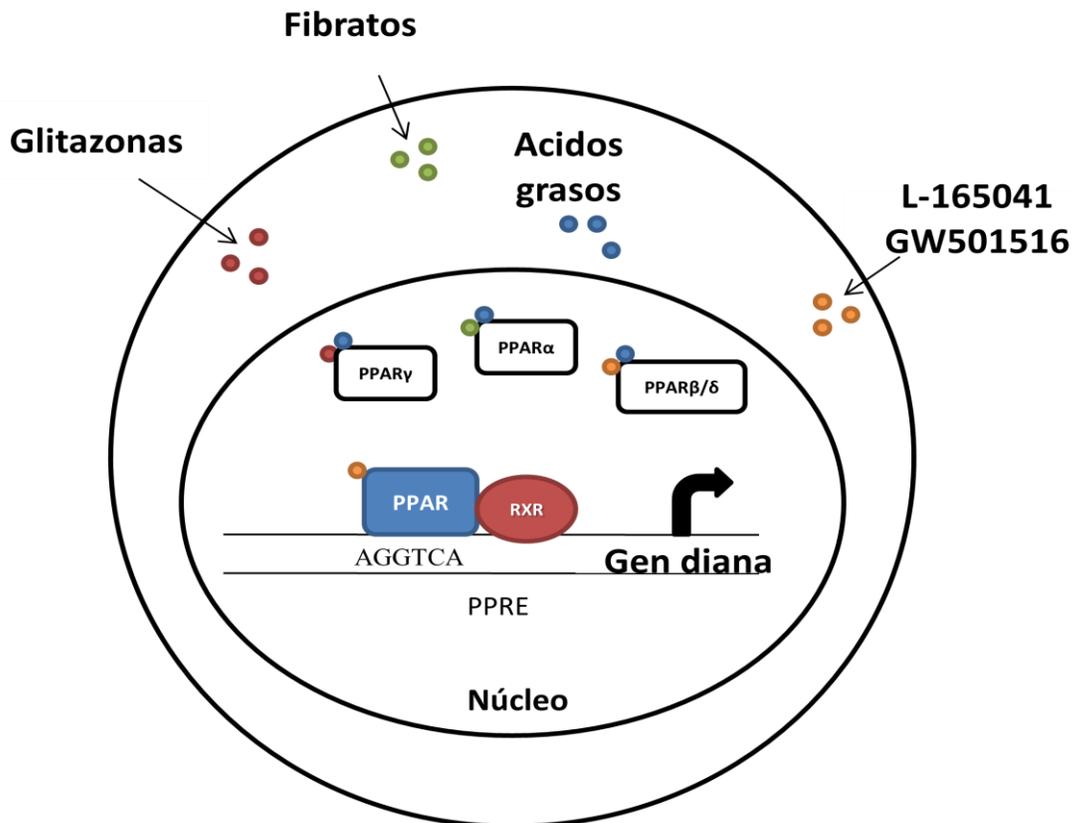


Figura 1. Mecanismo de activación de PPAR y sus activadores sintéticos y naturales (Modificado de Staels *et al.*, 1998).

Brevemente mencionaremos algunos ligandos reportados para los PPARs.

A) Ligandos endógenos.

Para PPAR α : ácidos grasos (AGs) como palmítico, esteárico, palmitoleico, oleico (AO), linoleico, araquidónico y eicosapentaenoico (EPA).

Para PPAR γ : Ac. Araquidónico, EPA, 15 deoxy PGJ12 y para PPAR β/δ : EPA y ácido linoleico (Ehrmann & Vavrusova, 2002)

B) Ligandos exógenos.

Para PPAR α : WY-14643, clofibrato, gemfrosil, nafenopin, bezafibrato, fenofibrato. Para PPAR β/δ : WY-14643, GW501516, y L-165041.

Para PPAR γ : Ibuprofeno, piroxicam, ciglitazona, pioglitazona, GW1929 (Ehrmann & Vavrusova, 2002)

Las diferentes isoformas de PPARs se expresan en el organismo en lugares específicos para cumplir con ciertas funciones (Cuadro 1). Por lo que son motivo de estudio como blanco terapéutico de diferentes padecimientos, especialmente en enfermedades cardiovasculares (Tenenbaum & Fisman, 2012). También están involucrados en la mejora del daño tisular (Michalik & Wahli, 2006), cáncer (Berger & Moller, 2002) y desórdenes neurodegenerativos (Heneka & Landreth, 2007).

Cuadro 1. Función y localización de las isoformas de PPARs

Isoforma	Localización	Función	Referencia
PPAR-α	Principalmente en hígado Músculo, riñón, corazón y huesos	Oxidación de AGs	(Tyagi <i>et al.</i> , 2011)
PPAR-β/δ	En todo el organismo	Regulación del gasto de energía y promueve el metabolismo de AGs	(Berger & Moller, 2002)
PPAR-γ	γ_1 : En todos los tejidos γ_2 : En tejido adiposo γ_3 : En macrófagos, intestino y tejido adiposo γ_4 : En células endoteliales	Regula el almacén de energía	(Evans, Barish, & Wang, 2004)

1.1 Función de los PPARs en el Sistema Nervioso Central (SNC)

Los padecimientos neurodegenerativos como esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la enfermedad de Alzheimer (EA), de Parkinson (EP) y de Huntington (EH) comparten en su patogénesis la participación del estrés oxidante, debido a la alta producción de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) y de nitrógeno (ERN). El daño oxidante modifica la homeostasis de calcio (Ca^{2+}) intracelular, produciendo una liberación alta de estos iones, lo que conlleva a un papel en la formación de EROs, a través de canales asociados a receptores de tipo N-metil-D-aspartato (nNMDA) activados por los aminoácidos excitadores (Martínez-lazcano *et al.*, 2010). Los PPARs tienen un papel importante en la patogénesis de algunos desórdenes del SNC (Michalik & Wahli, 2006). La activación de las tres isoformas de PPARs, está relacionada con la protección observada en modelos de enfermedades neurodegenerativas como ELA, EA, EP, EH y encefalomiелitis autoinmune. En los modelos antes mencionados se encontró que existe una vía de señalización que se activa en conjunto con el co-activador PGC-1 α y regula la expresión de genes del metabolismo energético mitocondrial. El co-activador PGC-1 α se encuentra altamente expresado en corazón, riñón, músculo esquelético y cerebro, en este último participa principalmente en la sobrevivencia de neuronas GABAérgicas (Cowell, Blake, & Russell, 2007; Lin, Handschin, & Spiegelman, 2005).

Específicamente la EH es un desorden neurodegenerativo causado por una expansión anormal del trinucleótido CAG (>36), que codifica para el aminoácido glutamina, en el exón 1 del gen de la huntingtina (*HTT*) y da lugar a la proteína huntingtina mutada (*HTTm*). Un paciente con EH presenta alteraciones psiquiátricas, y una combinación de características motoras, cognitivas y de conducta (Yu *et al.*, 1993). La proteína *HTTm* está expresada de manera ubicua pero se observa una pérdida neuronal selectiva en el cerebro, particularmente en el estriado. Se han propuesto distintos mecanismos por los cuales esta proteína mutada provoca sus efectos tóxicos, entre los cuales están la desregulación transcripcional, anormalidades en metabolismo energético mitocondrial, agregación proteica y el daño oxidante (Browne & Beal, 2004). Además el circuito motor de los ganglios basales, específicamente la vía indirecta, está desregulada debido al daño producido en la neuronas espinosas medianas GABAérgicas del estriado que comprenden el 98% de la población en este núcleo (ver abajo) (Bates *et al.*, 2015).

1.2 Circuito motor de los ganglios basales en individuo sano e individuo con la EH

El circuito motor se conforma de los ganglios basales (estriado, globo pálido interno-GPi, globo pálido externo-GPe, sustancia nigra compacta-SNc, sustancia nigra pars reticulada-SNr, núcleo subtalámico- NST), la corteza y el tálamo (Purves & Williams, 2001).

El estriado (caudado-putamen) es el principal núcleo de entrada de los ganglios basales debido a que modula la información sensomotora y cognitiva para el control óptimo del comportamiento, éste recibe la entrada excitatoria glutamatérgica de la corteza entera y al procesarse las señales, éstas son transmitidas a los núcleos de salida (GPi y SNr). Existen dos vías por las cuales son moduladas las proyecciones de salida GABAérgicas: la vía directa que resulta en la desinhibición del tálamo y su activación conduce al incremento de movimientos voluntarios, y la vía indirecta que tiene como objetivo principal la inhibición del NST atenuando los procesos relacionados al movimiento (Miller & Bezprozvanny, 2010).

En la vía directa las eferentes estriatales que preferentemente expresan receptores a dopamina tipo 1 (D1), proyectan hacia el GPi el cual a su vez proyecta al tálamo mientras que en la vía indirecta donde se expresan los receptores a dopamina tipo 2 (D2) transitoriamente activan las neuronas inhibitorias desde estriado a neuronas inhibitoras tónicamente activas del GPe. Posteriormente el GPe proyecta al NST que recibe una fuerte entrada excitatoria de la corteza. A su vez el NST proyecta hacia el GPi donde su excitación transitoria resulta en una oposición la acción desinhibidora de la vía directa (Purves & Williams, 2001).

El desbalance de estas dos vías reguladoras tiene como efecto la disfunción motora en la EH. La proyección del estriado hacia el GPe (vía indirecta) se encuentra disminuida debido a la degeneración de las neuronas espinosas medianas GABAérgicas. Este efecto incrementa la inhibición tónica del GPe al NST, haciendo al NST excitatorio menos efectivo en oposición a la acción de la vía directa. A consecuencia la excitación talámica de la corteza es incrementada dando lugar a una actividad motora inadecuada (DeLong, 1990) (Figura 2).

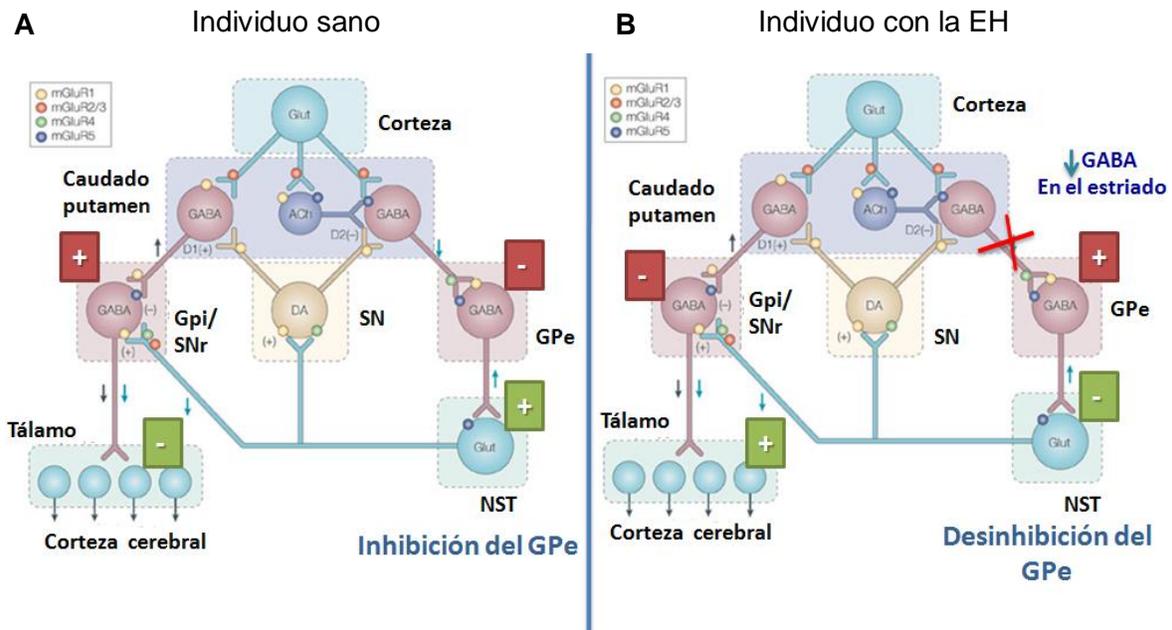


Figura 2. Circuito motor de los ganglios basales. **A** Individuo sano, comprende las vías directa e indirecta, las cuales tienen como objetivo principal la desinhibición del tálamo y la inhibición del GPe respectivamente. **B** Individuo con la EH, existe disminución en las neuronas GABAérgicas que expresan receptores D2 (receptores dopaminérgicos que siguen la vía indirecta) dando lugar a la desinhibición del GPe. Los recuadros verdes y rojos representan las señales excitadoras e inhibitoras respectivamente de la vía indirecta del circuito motor.

Gpi – globo pálido interno, GPe- globo pálido externo, SN-sustancia nigra, SNr- Sustancia nigra pars reticulada, NST- núcleo subtalámico, Glu- glutamato, GABA-Ácido γ -aminobutírico, DA- dopamina, Ach- acetilcolina, mGluR1, mGluR2/3, mGluR4, mGluR5 - Receptores metabotrópicos a glutamato subtipo 1, 2/3, 4, 5.

1.3 Disfunción y daño bioenergético mitocondrial en la EH

Las primeras anomalías mitocondriales en pacientes con EH, fueron identificadas por Goebel y cols. (1978), después de realizar estudios ultraestructurales de biopsias corticales de enfermos juveniles y adultos. Asimismo en los pacientes con la EH existe evidencia de la disfunción en la bioenergética mitocondrial, mostrando en ellos: pérdida de peso, disminución del metabolismo glucolítico y concentraciones elevadas de lactato en los ganglios basales y la corteza cerebral, además del decremento en N-acetil aspartato

(Grafton *et al.*, 1992; Jenkins *et al.*, 1998; Kuwert *et al.*, 1993; Turner & Schapira, 2010), sugiriendo estos efectos como los primeros indicios de la aparición de la enfermedad. Por otra parte en los pacientes con EH, existen alteraciones en la actividad de los componentes de la fosforilación oxidativa y del ciclo del ácido tricarboxílico disminuyendo la actividad de los complejos II-IV y la aconitasa (Browne & Beal, 2004; Turner & Schapira, 2010) lo que provoca un decremento en la respiración mitocondrial.

Estudios realizados en pacientes y en modelos experimentales sugieren que la HTTm que afecta poblaciones celulares del sistema nervioso central y periférico, en particular para este último células con alta demanda de energía. De tal manera se ha reportado que linfocitos provenientes de pacientes con la EH tienen el potencial de membrana mitocondrial (PMM) reducido, una morfología alterada (Squitieri *et al.*, 2006), y presentan un incremento en el proceso de apoptosis (Almeida, Sarmiento-Ribeiro, Januário, Rego, & Oliveira, 2008) y deterioro en la homeostasis de Ca^{2+} (Panov *et al.*, 2002). Por lo que toca a los tejidos musculares se ha reportado una disminución en la relación ATP/fosfocreatina (PCr), la relación PCr/fosfato inorgánico y los niveles de ATP; observándose que la actividad del complejo I está alterada (Arenas *et al.*, 1998; Mochel & Haller, 2011). Tanto en pacientes de EH como en ratones transgénicos NLS-N171-82Q se presentó en el cerebro y en el músculo (mioblastos) una expresión atenuada de citocromo oxidasa, y una disminución de la tasa de respiración mitocondrial (Chaturvedi & Beal, 2008).

Debido a todo lo que antecede se propuso a la HTTm como la causante de disfunción mitocondrial por distintos mecanismos que resultan en la inhibición de la succinato deshidrogenasa (SDH) y del complejo II de la cadena de respiración, lo cual induce un aumento de EROs y decremento en niveles de ATP. Por otra parte, la HTTm deteriora la capacidad de regulación de Ca^{2+} , mejora la transición de permeabilidad mitocondrial de apertura de poro y la liberación de citocromo C. La HTTm también se une a factores de transcripción como TAF-II, CBP, SP-1, PPARs y al co-activador PGC-1 α , involucrándose en la regulación de la biogénesis y la respiración mitocondrial (ver figura 3) (Chaturvedi & Beal, 2013).

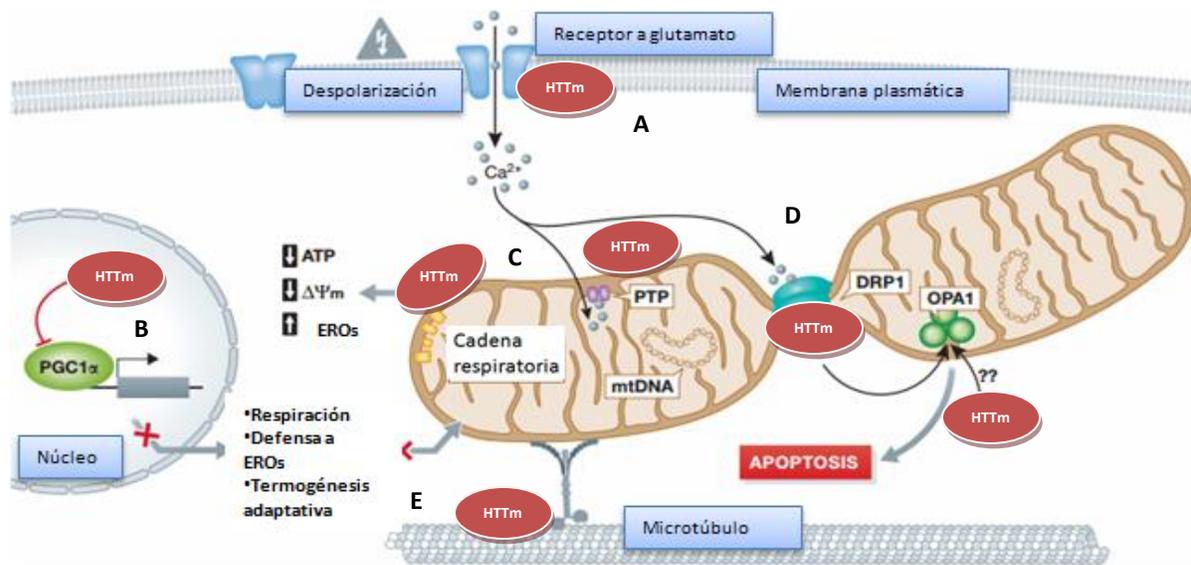


Figura 3. Disfunción mitocondrial en la EH. (A) La huntingtina mutada (HTTm) actúa en la membrana plasmática, donde se une a la membrana alterando su función o se agrega en receptores como los tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). (B) En la transcripción, inhibe y reduce al co-activador PGC1 α de los PPARs. (C) En la mitocondria, se postula que incrementa la apertura del poro promoviendo la agregación de la HTTm en el complejo II de la cadena de respiración. (D) Con DRP1 (necesaria para el proceso de fisión), la HTTm causa la fragmentación y remodelación de las crestas mitocondriales. (E) En los microtúbulos, la HTTm reduce el transporte vesicular (Tomado y modificado de (Costa & Scorrano, 2012)).

1.4 Modelos experimentales para la EH

En cuanto a la búsqueda de terapias o blancos farmacológicos dirigidos a la EH, se pueden realizar estudio *in vitro*, empleando rebanadas cerebrales, homogenados de cerebro, sinaptosomas, mitocondrias o núcleos cerebrales (Rios & Santamaria, 1991), *In vivo* un modelos de la enfermedad puede ser inducido con ácido quinolínic (AQ, agonista de los rNMDA) o ácido 3- nitropropiónico (3-NP) mediante una inyección en el estriado de la rata o ratón, reproduciendo las características neuroquímicas de la EH (Coyle & Schwarcz, 1976; Schwarcz & Köhler, 1983). Además existen modelos transgénicos como los ratones R6/1, R6/2, N171-82Q, BAC-HD o incluso cultivos celulares de estriado SThdhQ111/Q111, entre otros.

1.4.1 Modelo Neuroquímico

Se ha reportado que la administración intraestriatal de aminoácidos excitotóxicos tales como ácido kaínico (KA), ácido iboténico (IBO), NMDA y Ácido Quinolínico (AQ) inducen neurodegeneración estriatal (M. Flint Beal et al., 1986; Coyle & Schwarcz, 1976; Ferrante, Kowall, Cipolloni, Storey, & Beal, 1993; Schwarcz et al., 1979; Schwarcz & Köhler, 1983).

En particular, el modelo de AQ es el más utilizado tanto en roedores como en primates no humanos. El AQ es un metabolito endógeno del triptófano por la vía de la kinurenina y actúa como agonista del glutamato de forma selectiva para los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (Hargreaves & Pardridge, 1988).

El AQ se administra en el estriado, ya que no atraviesa la barrera hematoencefálica, y produce una despolarización celular por influjo de calcio intracelular que como consecuencia trae consigo la producción de radicales libres que llevan a la muerte celular específica en el estriado de las neuronas GABAérgicas, permaneciendo intactas las neuronas NADPH-diaforasa positivas y las interneuronas colinérgicas (Roberts, Ahn, Swartz, Beal, & DiFiglia, 1993). El mecanismo de muerte celular producido por la inyección de AQ reproduce lo que sucede en los cerebros de pacientes con la EH (M F Beal, Ferrante, Swartz, & Kowall, 1991). Por otro lado, una inyección unilateral de apomorfina (agonista de la dopamina) provoca un comportamiento rotatorio (Vazey, Chen, Hughes, & Connor, 2006), así como problemas motores en las patas delanteras contralaterales al hemisferio dañado (McBride *et al.*, 2003). Este modelo es muy útil para el estudio de fármacos neuroprotectores.

1.4.2 Modelo Transgénico R6/1

Específicamente el modelo transgénico R6/1 con 116 repetidos de CAG, contiene el exón I del gen de la HTTm del ser humano distribuido en su genoma, comprende un inicio y progresión de la enfermedad presentando los problemas motrices a las 15-20 semanas, una pérdida de masa muscular alrededor a las 22 semanas y pueden vivir hasta las 48 semanas (Ferrante, 2009). Debido a lo anterior, el ratón transgénico R6/1 representa a la EH de inicio tardío, el cual es útil para investigar diversas estrategias terapéuticas de larga duración. En cuanto a la neuropatología, la línea de los ratones R6/1 presenta una reducción en el volumen cerebral a las 18 semanas y una atrofia neuronal, pero sin

pérdida de neuronas. Las inclusiones intraneuronales de la HTT comienzan a los 2 meses (Zheng & Diamond, 2012).

1.5 Estudios de *docking*

Para comprender completamente el mecanismo de interacción de un receptor con su ligando, se han desarrollado técnicas computacionales basadas en la estructura química de las moléculas interactuantes. Aunque en su mayoría con modelos rígidos, en un modelo estructural tridimensional, el mutuo reconocimiento entre las moléculas puede tener una explicación en términos de interacciones atómicas. A esta técnica se le ha llamado *docking* (en inglés) o reconocimiento molecular. Para el caso de los receptores PPARs, debido al interés que estos han desarrollado, es de interés conocer los residuos participantes y que regulan la interacción con un ligando. Esto ayudaría a entender sus posibles modificaciones estructurales con efectos biológicos, así como el diseño de nuevas moléculas dirigidas a los PPARs.

El acoplamiento (*docking*) molecular es un método computacional que busca formas predecir el modo de unión entre ligandos potenciales (un fármaco) y un blanco macromolecular (principalmente proteínas), cuya estructura es conocida experimentalmente. Las metodologías de acoplamiento molecular son de gran importancia en la planificación y diseño de nuevos fármacos (Guedes, de Magalhães, & Dardenne, 2014).

El acoplamiento molecular consiste en tres objetivos principales relacionados: la posición de la predicción, la proyección virtual y la estimación de la afinidad de unión (Jain & Nicholls, 2008). Esto tiene la finalidad es encontrar la unión más probable entre el ligando y el receptor, es decir, la que menos energía requiera (a menor energía, más fuerte la unión) así como el sitio idóneo de unión molecular. Una metodología de acoplamiento exitosa debe ser capaz de predecir correctamente la posición del ligando nativo dentro del sitio de unión al receptor (es decir, encontrar la geometría del ligando experimental dentro de un determinado límite de tolerancia) y las interacciones químicas físico-químicas asociadas (Kolb & Irwin, 2009).

Los PPARs consisten en proteínas con cuatro dominios estructurales: AF-1, de fosforilación; DBD – Dominio de interacción con DNA (PPREs); LBD - Sitio de unión al ligando y AF-2 –Actividad dependiente de unión del ligando. El sitio de unión al ligando

está formado por una cavidad cerrada por las hélices H2', H3, H4, H5, H7, H10 / H11, H12 y por las láminas beta S3 y S4 (Zoete et al., 2007).

1.6 Participación de las Isoformas de PPARs en la búsqueda de terapias para la EH

Actualmente no hay cura disponible para la EH, por lo que se continúan realizando estudios enfocados en la búsqueda de blancos terapéuticos. Existe evidencia de que el incremento de la HTTm daña la homeostasis metabólica y causa desregulación transcripcional (Tabrizi *et al.*, 1999). Al respecto las isoformas PPAR β/δ y PPAR γ son objeto de estudio como blancos terapéuticos para la protección en la EH, ya que sus agonistas disminuyen la expresión de ciclooxigenasa-2 (COX-2; enzima que participa en la producción de EROs) e incrementan la expresión de enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc (SOD-Cu/Zn) (Fernández-Gómez *et al.*, 2008).

La isoforma PPAR α no está predominante localizada en el cerebro, lo que no se le involucra con la neuroprotección pero si está ampliamente expresada en tejidos con actividad de oxidación de AGs, principalmente en el hígado (Viswakarma, Jia, & Bai, 2010). Sin embargo estudios recientes muestran la implicación de ésta en la función normal cognitiva (D'Agostino *et al.*, 2015), en la EA regulando vías benéficas (Vallée & Lecarpentier, 2016).

Existen estudios que reportan a los agonistas de PPARs como blancos terapéuticos tanto en modelos experimentales para la EH, como en otros modelos de enfermedades neurodegenerativas en los que la mayoría están enfocados en la activación de la isoforma PPAR γ . Sin embargo existen escasos estudios enfocados al efecto neuroprotector de agonistas de la isoforma PPAR β/δ , por lo que es necesario analizar el mecanismo por el cual ejerce su efecto. En relación con la EH, existe evidencia *in vitro* que muestra que la activación de PPAR γ por sus agonistas en células que expresan HTTm, atenúa la neurodegeneración mediante la prevención de la despolarización mitocondrial. Asimismo tratamientos con agonistas que activan a la isoforma γ , pioglitazona y rosiglitazona, mostraron efecto en cultivos de neuronas corticales de ratas y en células SH-SY5Y disminuyendo el estrés oxidante y la sobreexpresión de COX-2 (Zhao, Patzer, Herdegen, Gohlke, & Culman, 2006), se indujo un aumento en la expresión y actividad de

SOD, catalasa y complejos de la cadena de respiración (CO-I y CO-IV) (Hwang *et al.*, 2011; Miglio *et al.*, 2009).

También está reportado que en células PC12 el tratamiento con Rosiglitazona aumenta la expresión de la proteína Bcl-2 (Fuenzalida, Quintanilla, & Ramos, 2007). Interesantemente tanto en pacientes como en modelos transgénicos para la EH (R6/2 y N171-82Q), está reportada una baja expresión de PPAR γ , así como una alteración en la actividad de transcripción del co-activador PPAR- γ 1-alfa (PGC-1 α), por interacción con la Httm (M. Chiang, Chen, & Lee, 2010). Estudios en cultivos de células estriatales (STHdhQ111/Q111) y en modelos transgénicos (R6/2, N171-82Q) enfocados al estudio del co-activador PGC-1 α mostraron que el tratamiento con rosiglitazona recuperó los niveles de expresión de PPAR γ y de PGC-1 α , al igual que los niveles de la proteína Sirt6 (Jin *et al.*, 2013). Por otro lado, también se ha descrito que el tratamiento con rosiglitazona en ratones transgénicos, mejoró la función motora y atenuó la hiperglucemia, además de rescatar la deficiencia del factor neurotrófico derivado de cerebro en la corteza cerebral (M. Chiang *et al.*, 2010). A pesar de estar expresada mayoritariamente en el SNC, la isoforma PPAR β/δ , actualmente es la menos estudiada en su efecto neuroprotector. Entre la escasa evidencia de su participación en la neuroprotección se encuentran la reportada por Madrigal y cols. (2007), donde sugieren que PPAR β/δ , media el efecto neuroprotector de la noradrenalina y aumenta los niveles de GSH en un modelo neuronal de la EA inducido por el péptido 1-42 amiloide beta. Asimismo en un modelo in vivo de la EP, los agonistas PPAR β/δ , L-165041 y GW501516 evitaron la reducción de dopamina (Iwashita & Muramatsu, 2007). Recientemente fue demostrado en un modelo de ratones BAC-HD, que la Httm reprime la activación PPAR β/δ y que el agonista selectivo GW501516 abatió la disfunción mitocondrial además de la recuperación de PGC-1 α en neuronas primarias BAC-HD, mejorando así la supervivencia neuronal (Dickey *et al.* 2013). Por otro lado, un análisis de microarreglos de genes regulados por PPAR β/δ en tejido *post mortem* de pacientes de EH en etapas tempranas demostró que el co-activador PGC-1 α está reducido en pacientes respecto al tejido control (Dickey *et al.*, 2016). Confirmando la importancia del PPAR β/δ en su seguimiento como blanco terapéutico, Dickey y cols. (2016), generaron un ratón transgénico, con una dominante negativa condicionada denominado PPAR-E411P, estos roedores mostraron un fenotipo neurodegenerativo con defectos mitocondriales, reducción en el volumen cerebral y un marcado déficit motor a los 8 meses de edad. Todos estos hallazgos destacan la importancia de los PPARs en la neuroprotección en modelos neurodegenerativos con particular enfoque en la EH. Por lo

que es necesario conocer la efectividad de los agonistas más utilizados, explorar la vía por la cual están actuando y verificar la participación mayoritaria de la isoformas PPAR γ y PPAR β/δ .

Experimentalmente no está totalmente estudiada la afinidad de PPARs con estos ligandos endógenos, aunque se ha reportado por *docking* y simulaciones de dinámica molecular en los que se ha comprobado la alta afinidad de PPARs con DHA, mostrando cambios estructurales en los 4 primeros carbonos de DHA (Gani & Sylte, 2008). Los beneficios que otorga el DHA en el organismo pueden estar relacionados con la alta afinidad que muestra con PPARs en la simulación.

Hasta el momento no se tiene reportes de la afinidad de EPA aunque también han sido estudiados otros agonistas como el GW409544 derivado de farglitazar (Ma, Wang, Xu, Wang, & Chou, 2012), Zoete y cols. (2007) realizaron un estudio en el cual conjuntan agonistas de PPARs para el entendimiento de la estructura a nivel atómico, de éstos unidos al dominio de unión al ligando (LBD-ligand binding domain), y la explicación de su activación por la interacciones de LBD PPARs con co-activadores o co-represores.

La realización construcciones de PPARs con otros ligandos ayudará a explorar y predecir las regiones funcionales y residuos de interés.

2. Justificación

La enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad que cursa con una degeneración neuronal selectiva, a consecuencia del daño producido por la interacción de algunos marcadores específicos con los agregados de HTTm que dan lugar a alteraciones psiquiátricas, motoras y bioquímicas como el aumento en el estrés oxidante.

Hasta el momento no hay cura para este padecimiento por lo que son necesarias alternativas terapéuticas para esta patología.

Aunque se ha reportado que agonistas de PPAR- γ y PPAR- β/δ están participando en el mecanismo neuroprotector a través de la disminución del estrés oxidante por aumentar la expresión de marcadores antioxidantes, se desconoce la efectividad particular de éstos, y las vías de señalización involucradas.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Evaluar la efectividad terapéutica de agonistas PPARs con particular enfoque a la isoforma PPAR β/δ y γ en el mecanismo molecular involucrado en la protección neuronal en modelos de la EH.

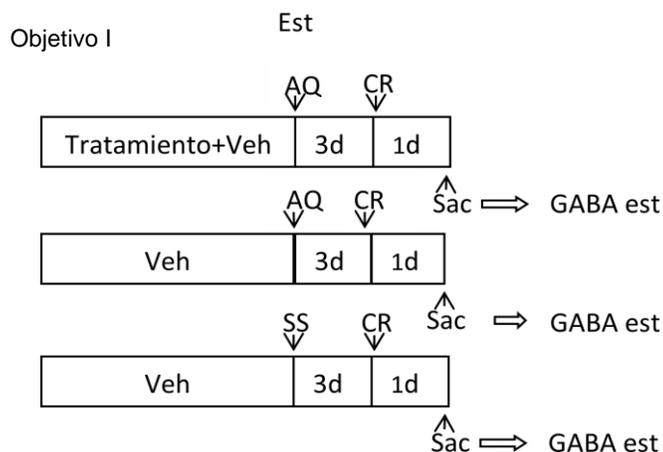
3.2 Objetivos específicos

- I. Evaluar el efecto protector por conducta y síntesis de GABA de los agonistas PPARs (pioglitazona, GW1929, L-165041, GW501516, AO y EPA) en un modelo de EH inducido con AQ.
- II. Evaluar el efecto antioxidante mediado los agonistas PPARs (pioglitazona, GW1929, L-165041, GW501516, AO y EPA) en un modelo de EH inducido con AQ.
- III. Realizar el reconocimiento molecular y simulación por dinámica molecular de la interacción de PPAR γ con los diferentes agonistas
- IV. Evaluar el efecto antioxidante estriatal y la conducta motora en ratones transgénicos R6/1 tratados con el agonista de PPARs que presente mayor efecto en el objetivo II.
- V. Medir la capacidad de respiración de mitocondrias de ratones transgénicos R6/1 tratados con un agonista de PPARs.

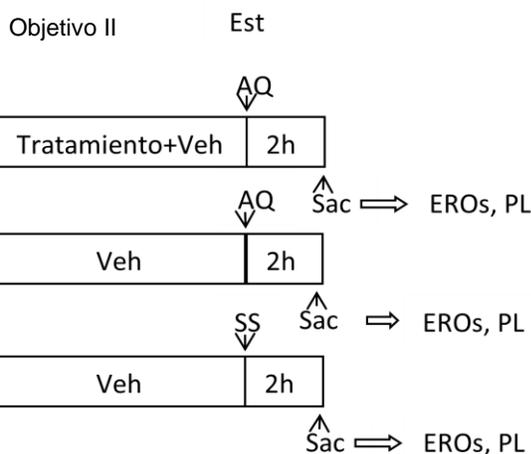
4. Estrategia experimental

Para cumplir con los objetivos planteados en el proyecto, se realizaron cuatro distintos protocolos. Cada uno incluye su diseño experimental correspondiente y se especifica los objetivos se alcanzaron en su aplicación.

Protocolo 1



Protocolo 2



Tratamientos:

1. Pioglitazona (20mg/kg) 2h i.p. (Medhi, Aggarwal, & Chakrabarti, 2010)
Veh – DMSO
2. GW1929 (20mg/kg) 1h i.p. (Kaundal & Sharma, 2011)
Veh- PEG 200
3. Ácido Oleico (60mg/kg) 3d oral (modificación de (Suzuki *et al.*, 2010))
Veh- CMC 0.5%
4. Ácido Eicosapentaenoico-EPA(60mg/kg) 3d oral (modificación de (Suzuky *et al.*,2010))
Veh- CMC 0.5%
5. GW501516 (10mg/kg) 30 min i.p. (Iwashita *et al.*,2007)
Veh- PEG 200
6. L-165041 (10mg/kg) 30 min i.p. (Iwashita *et al.*,2007)
Veh- PEG 200

Est- Estriado

AQ- Ácido Quinolínico

SS-Solución Salina

CR- Conducta Rotatoria

Sac- Sacrificio

EROs- Especies Reactivas de Oxígeno

PL- Peroxidación de Lípidos

Veh- Vehículos

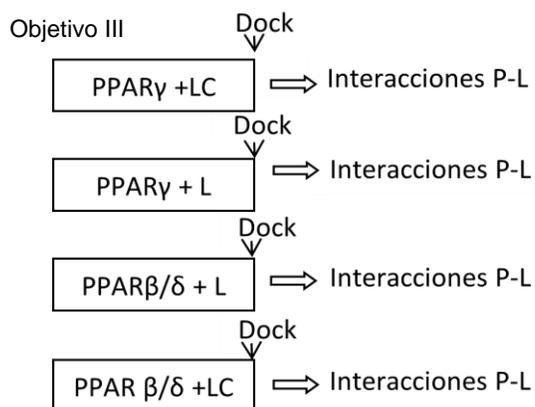
DMSO- Dimetil Sulfóxido

PEG- Polietilenglicol

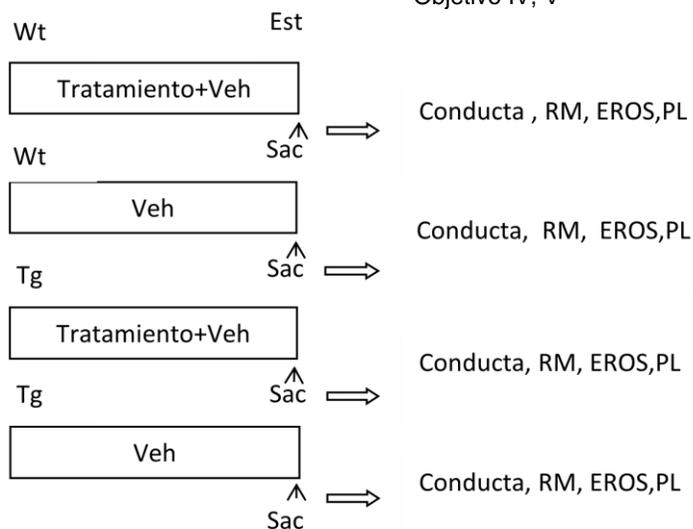
CMC- Carboximetilcelulosa

Estrategia Experimental

Protocolo 3



Protocolo 4



Tratamiento:

1. L-165041 (120 μ g o 10mg/kg) 6d icv. o i.p. (Iwashita et al.,2007)

Veh- PEG 200

Est- Estriado

Wt- Wild type

Tg- Transgénico R6/1

Veh- Vehículo

Sac- Sacrificio

RM- Respiración Mitocondrial

EROS- Especies Reactivas de Oxígeno

PL- Peroxidación de Lípidos

Dock- Docking

L- Ligando

LC- Ligando conocido

P-L Lipido- Proteína

5. Material y Métodos

5.1 Protocolo 1

5.1.1 Pretratamientos

Se administraron los siguientes tratamientos antes de la inducción al modelo de excitotoxicidad con AQ. 1) Pioglitazona, i.p. 2h antes de la lesión (20mg/kg-DMSO como vehículo); 2) GW1929, i.p. 1h antes de la lesión (20mg/kg- PEG 200 como vehículo); 3)GW501516, i.p. 30 min antes de la lesión (10mg/kg-PEG 200 como vehículo); 4)L-165041, i.p. 30 min antes de la lesión (10mg/kg- PEG 200 como vehículo); 5) AO y 6)EPA, estos dos últimos por vía oral (60mg/kg por 3 días- CMC como vehículo).

5.1.2 Modelo de excitotoxicidad inducido por la lesión estereotáxica con AQ.

Se utilizaron ratones C57Black macho de 25-30 g de peso, mantenidos con agua y alimento *ad libitum* bajo condiciones de temperatura, humedad y ciclos luz-oscuridad controlados. Bajo anestesia profunda con pentobarbital sódico a una dosis de 50 mg/kg i.p., los ratones fueron colocados en un aparato estereotáxico para inyectar 1 μ L de AQ (30 nmoles/ μ L) en el cuerpo estriado del hemisferio derecho, usando las siguientes coordenadas: 0.6 mm anterior, -2.2 mm lateral a bregma y -2.7 mm ventral a la duramadre (Franklin & Paxinos, 2001).

5.1.3 Evaluación conductual

La conducta rotatoria se evaluó tres días después de la lesión estriatal, esta prueba se aplicó a todos los grupos. Los ratones fueron administrados por vía subcutánea con apomorfina (1mg/kg) disuelta en una solución antioxidante de ácido ascórbico, preparada el mismo día. Los animales se colocaron en cajas de acrílico independientes, limpias, deodorizadas con metanol y una cama delgada de aserrín. Cinco minutos después de la administración de apomorfina (s.c) se cuantificó el número de giros ipsilaterales (lado derecho) que realizó cada ratón durante una hora.

5.1.4 Medición de los niveles de GABA.

Tres días después de la lesión con AQ en el ratón, se les administró un inhibidor de la glutamato descarboxilasa (GAD), el ácido 3-mercaptopropiónico (1.2 mmol/kg i.v.) para inhibir el incremento GABA *post mortem*. Dos minutos después, los animales fueron sacrificados por decapitación y se realizó la disección del cuerpo estriado derecho (lado lesionado). Los tejidos estriatales fueron homogenizados con 15 volúmenes metanol-agua (85% v/v). Las muestras fueron centrifugadas (3000 g durante 10 minutos) y se tomó el sobrenadante, posteriormente se almacenaron a -70°C hasta su análisis por HPLC. Los niveles de GABA se cuantificaron utilizando un método por HPLC con detección por fluorescencia, el cual fue validado previamente (Pérez-Neri *et al.*, 2007). Para la reacción de derivatización a la precolumna, se adicionaron 100 μL de reactivo de OPA a 100 μL de los sobrenadantes del tejido estriatal. Después de agitación continua durante 1 minuto, se inyectaron 20 μL de la mezcla al cromatógrafo de líquidos. Para llevar a cabo la separación, se utilizó una columna OPA-HS (RP 12.5 x 4.5 mm, tp 3 μm Alltech) con una fase móvil consistente de una solución 50 mM de acetato de sodio (pH 5.9), conteniendo 1.5% v/v de tetrahidrofurano, y metanol grado HPLC en un gradiente lineal que va desde un 10% hasta un 65% de metanol. La cuantificación se realizó por medio de un detector de fluorescencia.

5.2 Protocolo 2

Para cumplir con el objetivo 1

Los pretratamientos administrados antes de la inducción al modelo de excitotoxicidad con AQ fueron los mismos que se mencionan en el protocolo 1.

5.2.1 Modelo de excitotoxicidad inducido por la lesión estereotáxica con AQ

Se realizó como se describe en el protocolo 1.

Las evaluaciones indicativas del estrés oxidante se realizaron 2h después de la lesión con AQ o SSI, sacrificando a los animales de los diferentes grupos y obteniendo el estriado del lado lesionado.

5.2.2 Cuantificación de la peroxidación de lípidos.

A un mL de homogenado de estriado se agregó una mezcla de cloroformo-metanol (2:1, v:v). Posteriormente, la mezcla fue refrigerada por 30 minutos para permitir la separación de las fases, siempre protegida de la luz. La fase acuosa (fase superior) se aspiró con una bomba de vacío. Finalmente se transfirieron 2 mL de la fase orgánica (clorofórmica) a una celda de cuarzo y se agregaron 200 μ L de metanol. La muestra se analizó usando un espectrofotómetro de fluorescencia a longitudes de onda de 370 nm de excitación y 430 nm de emisión. Los resultados fueron reportados como unidades relativas de fluorescencia por mg de proteína (Pérez-Severiano, Ríos, & Segovia, 2000).

5.2.3 Cuantificación de la EROs.

Cuantificación de la formación de especies reactivas de oxígeno. La formación de especies reactivas de oxígeno fue evaluada utilizando diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA), el cual es oxidado por acción de las EROs para formar 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), la cual es capaz de generar fluorescencia (Ali, LeBel, & Bondy, 1992).

Cinco μ L del homogenado utilizado en la PL fueron mezclados con 45 μ L de solución amortiguadora TRIS-HEPES (18:1) (TRIS pH 7.4: solución HEPES conteniendo NaCl 120 mM, KCl 2.5 mM, NaH_2PO_4 1.2 mM, MgCl_2 0.1 mM, NaHCO_3 5 mM, glucosa 6.0 mM, CaCl_2 1.0 mM, HEPES 10.0 mM). A partir de esta mezcla se tomaron 5 μ L los cuales se incubaron con 145 μ L de solución amortiguadora TRIS-HEPES (18:1) y 50 μ L de DCF-DA 50 μ M a 37°C durante 1 hora con agitación constante en una placa de 96 pozos. Posteriormente se realizó la determinación de la fluorescencia de cada muestra en un multi-lector de placa FLx800 (Biotek instruments, Inc.), a una longitud de onda de 488 nm de excitación y 525 nm de emisión. Los valores obtenidos fueron calculados a partir de la interpolación en una curva de calibración de diclorofluoresceína DCF 100 nM. Los valores de proteínas de cada muestra se utilizaron para expresar los resultados como nmoles de DCF /mg proteína/min.

5.3 Protocolo 3

Para cumplir con el objetivo III se llevaron a cabo estudios de acoplamiento molecular.

5.3.1 Estudios de Acoplamiento molecular (*Docking*)

Se obtuvo del sitio web el archivo PDB (Banco de datos de proteínas) PPAR- γ (2vv0) y PPAR- β/δ (1Y0S), el cual se envió al predictor de estructura secundaria I-TASSER para su posterior análisis de acoplamiento. Paralelamente se realizó una validación del método haciendo un re-*docking*, utilizando los programas Autodock tools y Autodock vina, de PPAR- γ con DHA y rosiglitazona como ligandos y enseguida de PPAR- γ con EPA, ácido oleico, Pioglitazona, GW1929. Por su parte, la validación para PPAR β/δ se realizó con GW501516 y posteriormente se analizó el acoplamiento con L-165041.

En Autodock tools se añadieron átomos de hidrógeno a las proteínas. A los ligandos se les asignaron cargas atómicas parciales. Se realizó el acoplamiento de ligandos flexibles sobre los receptores rígidos con potenciales de la red. Posteriormente se generaron los archivos .pdbqt tanto del receptor como del ligando para cargarlos en Autodock vina, además de un conf.txt con las especificaciones del *docking* dirigido, la caja se centró para cubrir los residuos del sitio de unión. La dimensión de la caja del sistema fue de 14 × 14 × 16 nm (Trott & Olson, 2009). Las interacciones del ligando con su receptor fueron analizadas en el software MOE.

5.4 Protocolo 4

Para cumplir con los objetivos IV y V

Se utilizó una línea de ratones transgénicos R6/1, los cuales poseen el exón 1 del HTT humano con la mutación y tiene alrededor de 116 repetidos de CAG.

Los ratones transgénicos fueron identificados por genotipificación por aislamiento de DNA y amplificación por PCR (Polymerase Chain Reaction) del exón1.

Para cumplir con los objetivos IV y V se empleó L-165041 120ug icv y 10mg/kg, un agonista específico para PPAR β/δ que resultó como uno de los fármacos que arrojó datos positivos (mayor neuroprotección) en los objetivos I y II. Se evaluaron tres edades, 11, 24 y 35 semanas, y se formaron 12 grupos experimentales como se observa en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Los grupos experimentales formados para el modelo transgénico R6/1.

	Edad (semanas)	Veh (PEG200)	L-165041 + Veh.
Transgénico	11	Grupo I	Grupo II
	24	Grupo III	Grupo VI
	35	Grupo V	Grupo VI
Silvestre	11	Grupo VII	Grupo VIII
	24	Grupo IX	Grupo X
	35	Grupo XI	Grupo XII

5.4.1 Administración del tratamiento

Ratones transgénicos R6/1 de 11 y 24 semanas de edad, se sometieron a una cirugía estereotáxica para la implementación de una cánula dirigida al ventrículo del hemisferio izquierdo utilizando como coordenadas 0.0 mm anterior y -1.2 lateral mm con respecto a la bregma. Cinco días después de la cirugía se llevó a cabo la administración del fármaco L-165041 (120 ug) por 6 días inyectando en flujo de 0.3 ul/min -2.5 mm ventral respecto a la duramadre.

Ratones de 35 semanas fueron administrados vía ip. A una dosis de 10 mg/kg del fármaco durante 6 días.

5.4.2 Evaluación conductual en el modelo transgénico para la EH (línea R6/1)

La evaluación conductual que se realizó en la línea R6/1, fue efectuada después de la administración del tratamiento con el agonista específico para PPAR β/δ L-165041(10 mg/kg o 120 ug). Y posterior a las evaluaciones conductuales de cada grupo, se realizó la medición de daño oxidante (formación de EROs y PL) en el tejido estriatal, respiración

mitocondrial. En todos los grupos experimentales con los animales transgénicos y silvestres se implementaron pruebas conductuales que indican el progreso de la enfermedad en el fenotipo motor. Para ello se utilizaron las siguientes pruebas conductuales: 1) la cuantificación de movimientos horizontales y verticales; 2) la prueba de rotarod; y 3) observación del “*feet clasping*”.

5.4.2.1 Cuantificación de movimientos horizontales y verticales

La cuantificación de movimientos horizontales proporciona información acerca del estado la actividad exploratoria y actividad general espontánea; los movimientos verticales podrían reflejar un estado de ansiedad y sedación. Se llevó a cabo utilizando el equipo Opto-Varimex (Columbus Instruments, Columbus, OH, USA), en el cual se evalúa la actividad locomotora del animal, colocándolo en una caja (42.2 × 42.5 × 20.5 cm) que está equipada con una serie de sensores para el análisis de distintas pruebas, entre las que se encuentran los movimientos horizontales (conteo total combinado de los ejes x,y) y verticales (conteo total del sensor del eje z). La evaluación inicia al momento de colocar al animal dentro de la caja en una sesión 10 minutos se cuantifican los movimientos.

5.4.2.2 Prueba de rotarod

La prueba de rotarod proporciona información acerca de la coordinación motora y el equilibrio del animal. Los animales son entrenados tres días consecutivos a tres diferentes velocidades (10, 20 y 30 rpm). Al cuarto día se lleva a cabo la prueba final que consiste en dos intentos bajo condiciones de aceleración del rotarod (4-40rpm) en un periodo de 300 segundos (Arregui, Benítez, Razgado, Vergara, & Segovia, 2011).

5.4.2.3 Feet clasping

Está reportado que alrededor de la 20 semanas de edad, los ratones transgénicos de la línea R6/1, presentan un fenotipo denominado *feet clasping*, en el cual se observa que al ser suspendido de la cola, el animal transgénico contrae sus patas delanteras tomando sus patas traseras, esto durante unos 5-10 segundos. Por lo que a las edades evaluadas se revisa si los animales presentan este fenotipo.

Después del tratamiento administrado con el agonista específico para PPAR β/δ L-165041 (10 mg/kg) en los diferentes grupos, se estimó en el estriado la formación de EROs y PL. Se aplicó el mismo procedimiento que en el Protocolo 2.

5.4.3 Respiración mitocondrial

Se colectaron las regiones estriatales de ratones transgénicos R6/1 y *Wild Type* o silvestres, se homogeneizaron en medio I (Manitol 220 mM, Sacarosa 70 mM, MOPs 2 mM, EGTA 1 mM). Del homogenado se aislaron mitocondrias por centrifugación diferencial como se describe enseguida. El homogenado se centrifugó en una centrifuga Beckman J-21C en tubos de polipropileno a 2500 rpm por 10min a 4°C, posteriormente se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio. El sobrenadante se centrifugó a 7,500rpm por 10 min a 4°C, el sobrenadante resultante se desechó y el pellet se resuspendió en medio I y se agregaron 2 mL de medio II (Manitol 220mM, Sacarosa 70 mM, MOPs 2mM) con 1.25mg de albúmina. Esta mezcla se centrifugó a 7,500 rpm por 10 min a 4°C y se desechó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en medio I y se centrifugó a 9000 rpm por 10 min a 4°C. Los extractos mitocondriales se resuspendieron en 250 μ L de medio II (Muriel et al., 2005). Se midió el consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas usando un electrodo tipo Clark en microcelda (782 1-Chanel Oxygen System, Strathkelvin Instruments) a temperatura controlada de 24°C. El estado 4 (basal) de respiración se evaluó en presencia de succinato como sustrato (analizando los complejos I y II de la cadena de respiración) y el estado 3 (estimulado) estimulado con la adición de ADP. El control respiratorio se calculó mediante el cociente estado3)/estado4.

6. Resultados

6.1 Resultados del Objetivo I

El número de giros como parámetro de daño neuronal, fue evaluado en el modelo de la enfermedad de Huntington inducido por AQ 2h después del tratamiento con Pioglitazona 20 mg/kg (Figura 4A), 1h con GW1929 20 mg/kg (Figura 4B), tres días con ácido oleico (AO) y eicosapentaenoico (EPA) 60 mg/kg (Figura 4C,D), 30 minutos con GW501615 10 mg/kg y L-165041 10 mg/kg (Figura 4E,F), observándose que todos los agonistas de PPARs reducen significativamente el número de giros inducidos por el AQ; sin embargo, el agonista específico para PPAR- γ , GW1929, y los agonistas específicos para PPAR- β/δ , GW501615 y L-165041, mostraron un mejor efecto protector con respecto a los demás grupos.

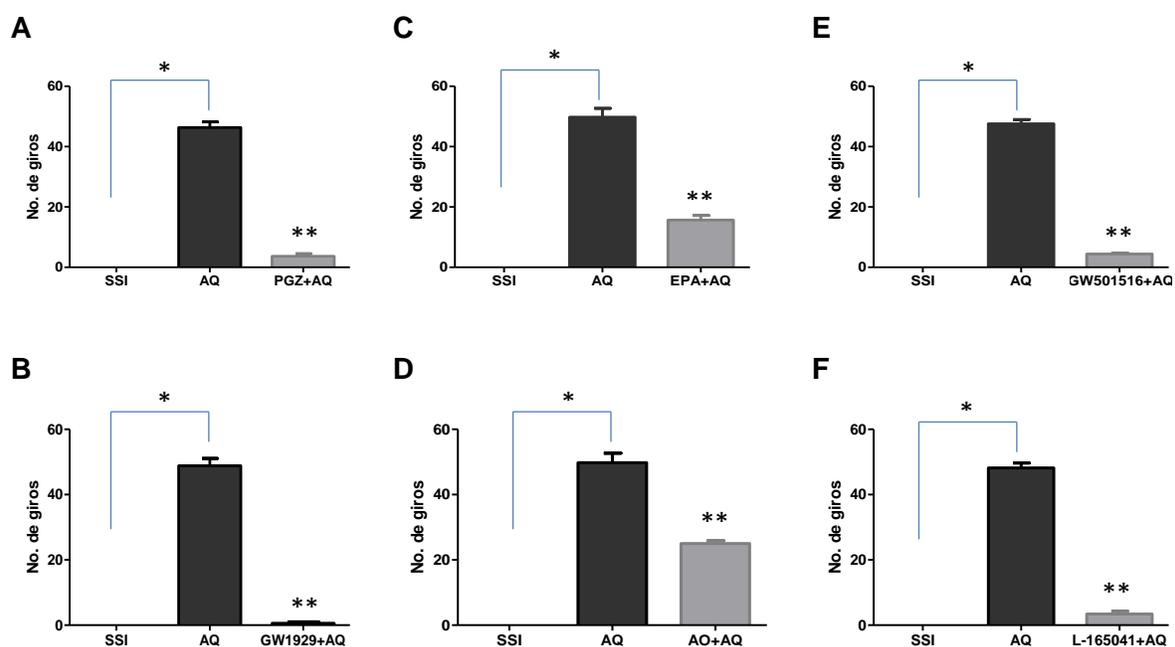


Figura 4. Evaluación de la conducta rotatoria después de la administración de tratamientos y la lesión con AQ. **A)** Pioglitazona * $p < 0.05$ diferentes del grupo SSI. ** $p < 0.05$ diferentes del grupo AQ. **B)** GW1929 * $p < 0.05$ diferentes al grupo SSI. ** $p < 0.05$ diferentes del grupo AQ. **C)** EPA * $p < 0.05$ diferentes del grupo SSI. ** $p < 0.05$ diferentes del grupo AQ. **D)** Ácido oleico * $p < 0.05$ diferentes al grupo SSI. ** $p < 0.05$ diferentes del grupo AQ. **E)** GW501615 * $p < 0.05$ diferentes del grupo SSI. ** $p < 0.05$ diferentes del grupo AQ. **F)** L-165041 * $p < 0.05$ diferentes al grupo SSI. ** $p < 0.05$ diferentes del grupo AQ. Los valores representan el promedio \pm el error estándar de 6 a 8 animales por grupo. ANOVA seguido por Tukey.

Una vez que se cuantificaron los giros de los grupos de tratamiento y sus controles, se llevó a cabo la medición de los niveles de GABA en el estriado, los cuales se muestran en la figura 5, donde se observa que los grupos tratados con Pioglitazona, EPA, AO, GW501516 y L-165041 presentan una recuperación de los niveles, sin embargo el grupo tratado con GW1929 tiende a recuperar estos niveles, pero no se observa significancia estadística respecto al grupo dañado con AQ. Por lo anterior la respuesta más efectiva en este parámetro fue de los tratamientos con agonistas específicos para la isoforma β/δ de PPAR y los tratamientos con ácidos grasos que pueden activar tanto a la isoforma β/δ como a la γ .

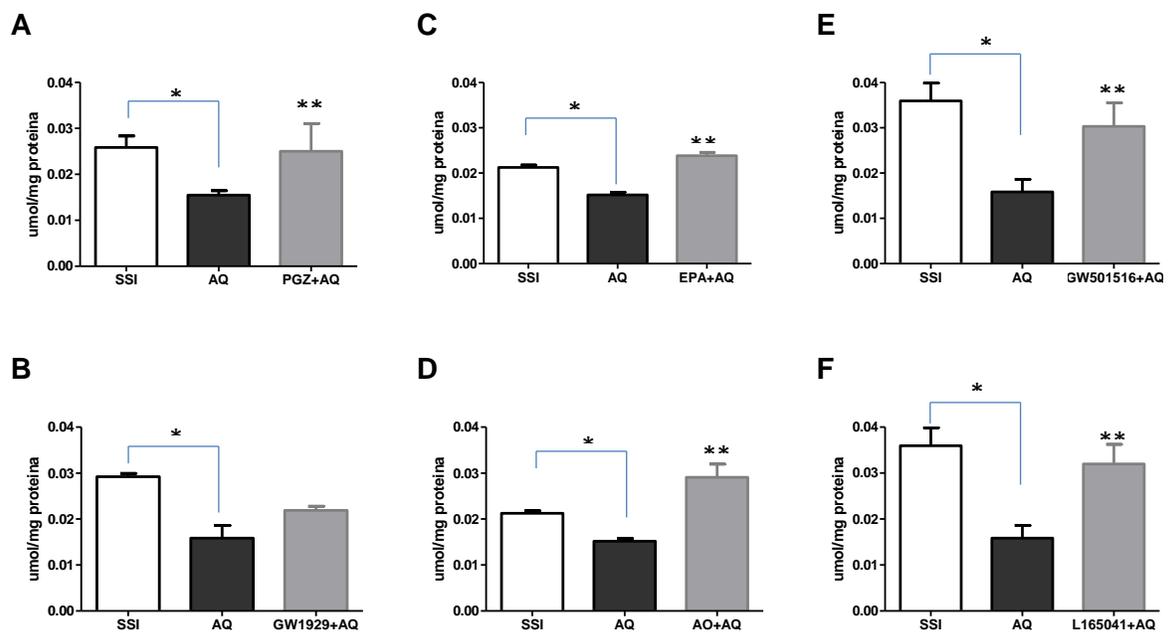


Figura 5. Medición de los niveles de GABA. **A)** Pioglitazona * $p < 0.05$ diferentes del grupo SSI ** $p < 0.05$ diferentes del grupo AQ. **B)** GW1929 * $p < 0.05$ diferentes al grupo AQ. **C)** EPA * $p < 0.05$ diferentes del grupo SSI. ** $p < 0.05$ diferentes del grupo AQ. **D)** AO * $p < 0.05$ diferentes del grupo SSI. ** $p < 0.05$ diferentes del grupo AQ. **E)** GW501516 * $p < 0.05$ diferentes del grupo SSI. ** $p < 0.05$ diferentes del grupo AQ. **F)** L-165041 * $p < 0.05$ diferentes al grupo SSI. ** $p < 0.05$ diferentes del grupo AQ. Los valores representan el promedio \pm el error estándar de 6 animales por grupo. ANOVA seguido por Tukey.

6.2 Resultados del Objetivo II

En la determinación del daño oxidante, propuesta en el protocolo 2, posterior a la administración con los mismos agonistas, se evaluó la peroxidación de lípidos (PL) y la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) en el modelo de la enfermedad de Huntington inducido por AQ (la inducción del modelo se describió en el protocolo 1).

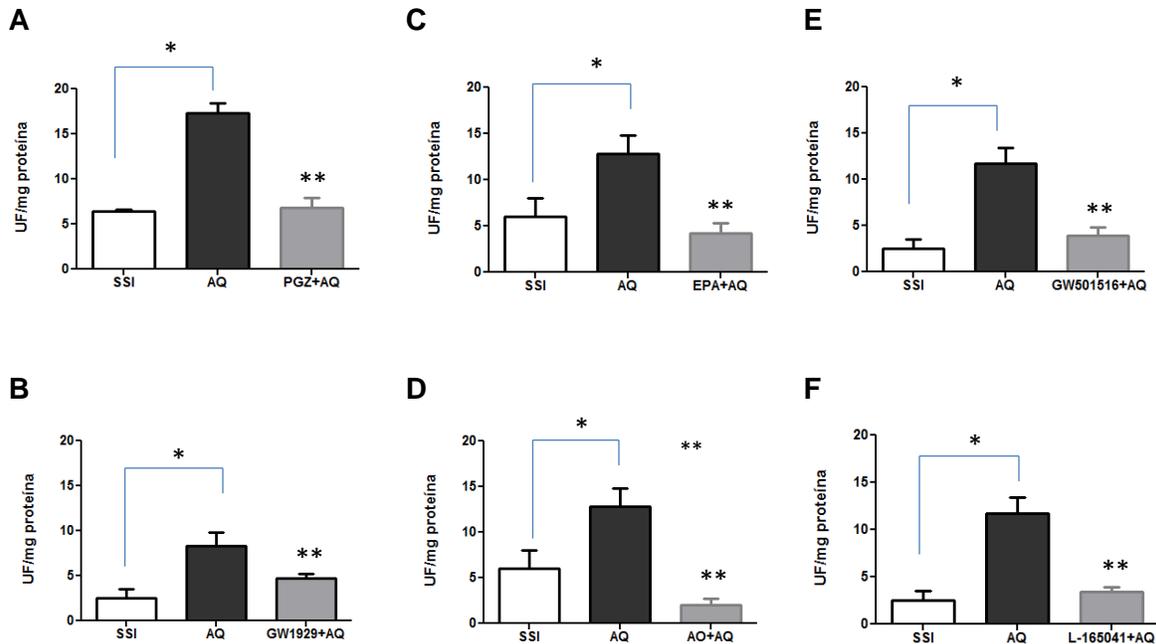


Figura 6. Evaluación de peroxidación de lípidos en estriado de ratones pretratados y lesionados con AQ. **A)** Pioglitazona * $p < 0.05$ diferentes del grupo SSI. **B)** GW1929 * $p < 0.05$ diferentes al grupo SSI. **C)** EPA * $p < 0.05$ diferentes del grupo SSI. ** $p < 0.05$ diferentes del grupo AQ. **D)** Ácido oleico * $p < 0.05$ diferentes al grupo SSI. ** $p < 0.05$ diferentes del grupo AQ. **E)** GW501516 * $p < 0.05$ diferentes al grupo SSI. **F)** L- 165041 * $p < 0.05$ diferentes al grupo VEH+AQ. ** $p < 0.05$ diferentes del grupo AQ. Los valores representan el promedio \pm el error estándar de seis animales por grupo. ANOVA seguido por Tukey.

Para medir el efecto antioxidante por la activación de los agonistas PPARs, se evaluó el daño oxidante por medio de la cuantificación de lípidos peroxidados y EROs formadas. En la cuantificación de lípidos peroxidados, se observa que los grupos dañados con AQ aumentan significativamente con respecto al grupo administrado con vehículo e inyectado con SS. Por otra parte, los grupos administrados con los agonistas y lesionados con AQ (Pioglitazona, GW1929, EPA, AO, GW501516, L-165041) reducen la PL con respecto a los grupos dañados con AQ y administrados con vehículo (Figura 6A-F).

Por otra parte, la administración de ambos agonistas, endógenos y exógenos, redujeron la formación de especies reactivas de oxígeno (Figura 7A-E), especialmente el agonista específico para PPAR β/δ , L-165041, y los agonistas endógenos, los cuales disminuyeron notablemente las EROs formadas, combatiendo el daño producido por acción del AQ.

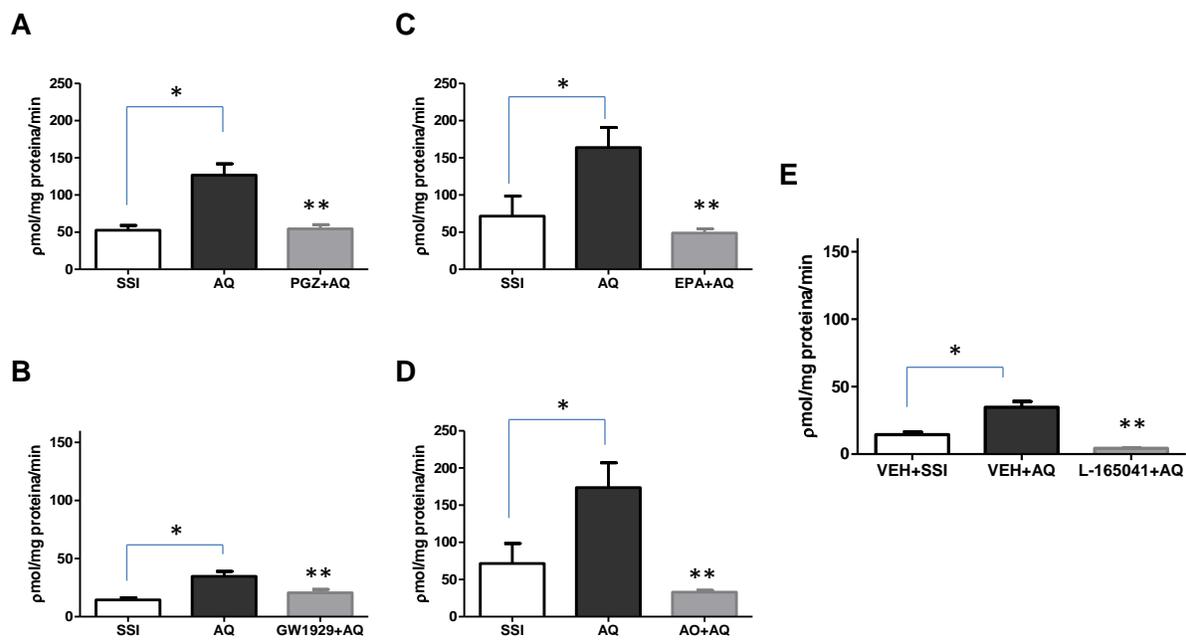


Figura 7. Cuantificación de EROs en estriado de ratones pretratados y lesionados con AQ. **A)** Pioglitazona * $p < 0.05$ diferentes del grupo SSI. ** $p < 0.05$ diferentes al grupo AQ. **B)** GW1929 * $p < 0.05$ diferentes al grupo SSI. ** $p < 0.05$ diferentes al grupo AQ. **C)** EPA * $p < 0.05$ diferentes del grupo SSI. ** $p < 0.05$ diferentes al grupo AQ. **D)** Ácido oleico * $p < 0.05$ diferentes al grupo SSI. ** $p < 0.05$ diferentes al grupo AQ. **E)** L-165041 * $p < 0.05$ diferentes al grupo SSI. ** $p < 0.05$ diferentes al grupo AQ. Los valores representan el promedio \pm el error estándar de 6 animales por grupo. ANOVA seguido por Tukey.

6.3 Resultados del objetivo III

6.3.1 Acoplamiento molecular (*Docking*)

6.3.1.1 Validación del método para la isoforma gamma con agonistas endógenos

PPAR γ +DHA

Con la validación del método se reprodujo el *docking* ya realizado con DHA como ligando, del cual se obtuvieron energía de afinidad ΔG (kcal/mol) y el RMSD (*root-mean-square deviation*) de los diferentes modelos descritos en el cuadro 3, los cuales muestran la energía de unión del ligando eligiendo la primera como la de menor energía requerida para la unión, por lo tanto la de mayor afinidad. De este acoplamiento resultaron 9 conformeros para los receptores.

Cuadro 3. Propiedades de los modelos de interacción de PPAR- γ + DHA.

Modelo	Afinidad	Distancia de RMSD I.b.	Distancia de RMSD u.b.
1	-7.1	0.000	0.000
2	-7.0	0.908	2.474
3	-7.0	1.324	2.036
4	-6.9	1.081	2.268
5	-6.9	3.382	8.068
6	-6.7	2.223	4.493
7	-6.7	3.288	8.508
8	-6.6	4.924	7.405
9	-6.5	5.233	7.636

RMSD I.b.- low bound

RMSD u.b. upper bound

Interesantemente en la Figura 8 se observan las interacciones del ligando con la proteína, formándose puentes de hidrógeno entre cuatro aminoácidos (Ser 289, His 323, Tyr 473, His 449) con el grupo carboxilo del DHA. El objetivo de *redocking* es verificar que los parámetros de acoplamiento especificados en el archivo de entrada, para el método de acoplamiento, son razonables y capaces de recuperar la estructura y las interacciones de un complejo conocido.

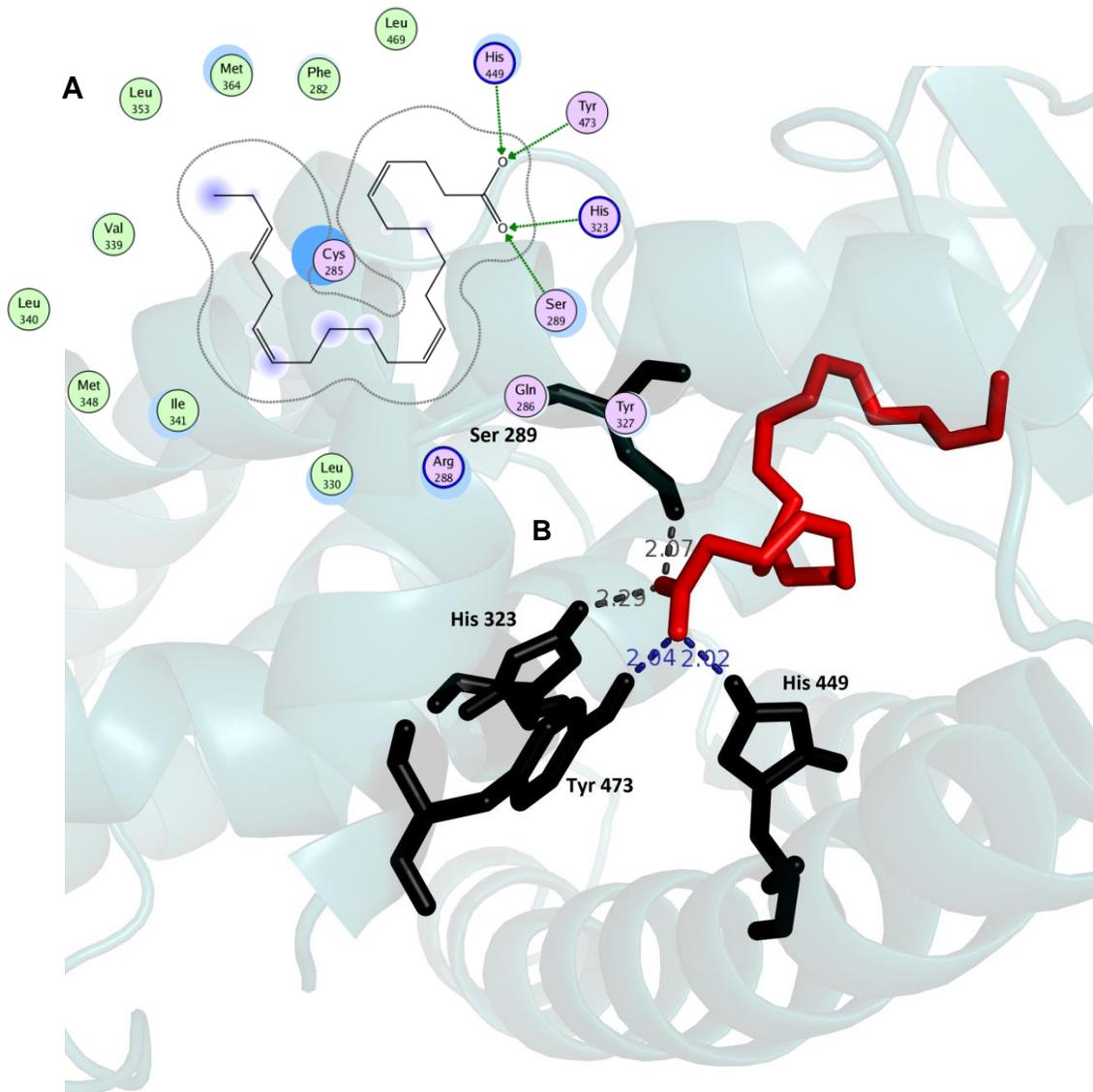
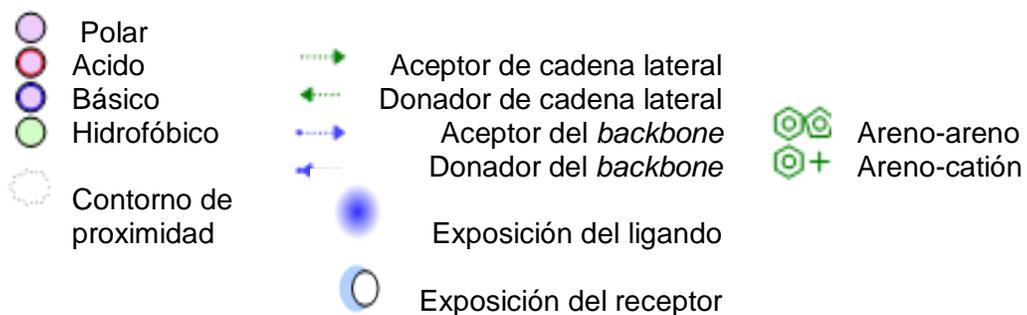


Figura 8. Validación del método, PPAR γ con DHA después del *docking*. **A** Mapa de contacto 2D obtenido del ligando con las interacciones formadas con Ser289, His323, Tyr473 e His449. **B** Estructura tridimensional de PPAR γ con DHA en el sitio de unión al ligando con distancias menores a 4Å.



Esta información nos indica que el método es viable para hacer el acoplamiento de otros ligandos parecidos al DHA debido a que estas interacciones ya habían sido reportadas reproduciendo otras metodologías como ICM-Dock.

6.3.1.2 Docking de PPAR- γ con AO y EPA

Una vez validado el método, se corrió el acoplamiento del mismo receptor pero con AO y EPA como ligandos. Los ΔG obtenidos fueron de -5.8 y -7.1 kcal/mol para AO y EPA respectivamente (Cuadro 4 y 5). De ambos acoplamientos se obtuvieron 9 conformeros.

Cuadro 4. Propiedades de los modelos de interacción PPAR- γ + EPA.

Modelo	Afinidad	Distancia de RMSD	
		I.b.	u.b.
1	-7.1	0.000	0.000
2	-6.9	1.188	2.192
3	-6.8	2.578	3.704
4	-6.4	3.970	5.522
5	-6.4	4.010	5.997
6	-6.4	3.745	4.617
7	-6.3	5.163	8.471
8	-6.0	3.639	5.630
9	-5.9	5.136	7.041

RMSD I.b.- low bound

RMSD u.b. upper bound

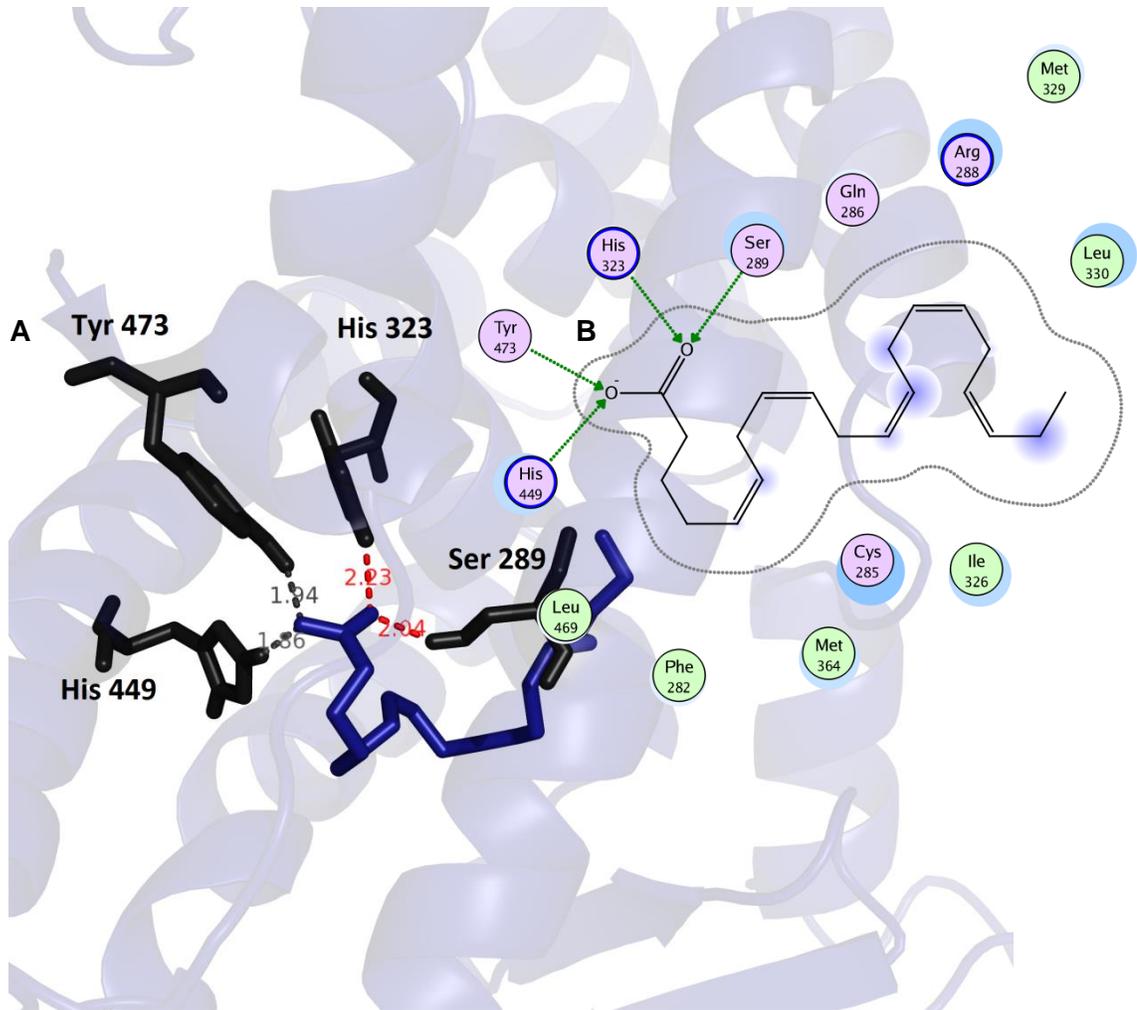
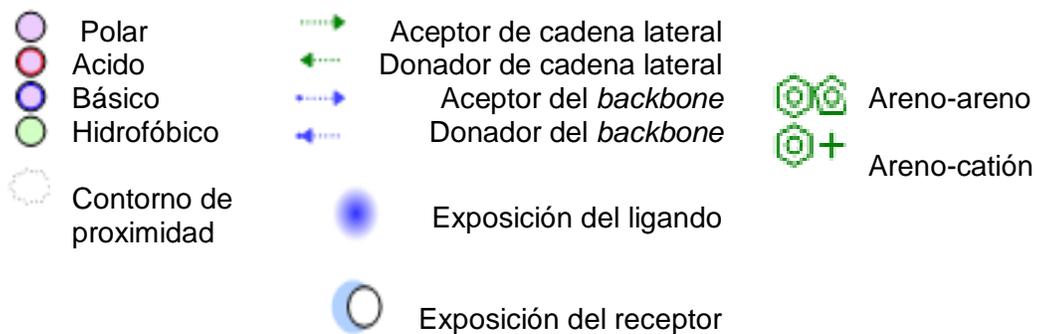


Figura 9. Interacciones entre el PPAR γ con EPA después del *docking*. **A** Estructura tridimensional de PPAR γ con EPA en el sitio de unión al ligando, distancias menores a 4Å. **B** Mapa de contacto obtenido del ligando con las interacciones formadas con Ser 289, His 323, Tyr 473 e His 449.



Cuadro 5. Propiedades de los modelos de interacción PPAR- γ + AO.

Modelo	Afinidad	Distancia de RMSD l.b.	Distancia de RMSD u.b.
1	-5.8	0.000	0.000
2	-5.7	1.983	2.882
3	-5.6	1.348	2.077
4	-5.5	1.449	2.214
5	-5.4	2.977	5.415
6	-5.3	2.332	4.585
7	-5.3	3.741	7.724
8	-5.2	1.888	3.422
9	-5.1	1.606	2.362

RMSD l.b.- low bound

RMSD u.b. upper bound

Del *docking* con EPA y AO resultaron distintas interacciones. Para el caso de EPA la Ser289, His323, Tyr473, e His449 del receptor (Figura 9), formaron puentes de hidrógeno con el grupo carboxilato. Por otra parte, el AO formó solo tres puentes de hidrógeno con Ser289, Tyr473, e His449 del receptor (Figura 10).

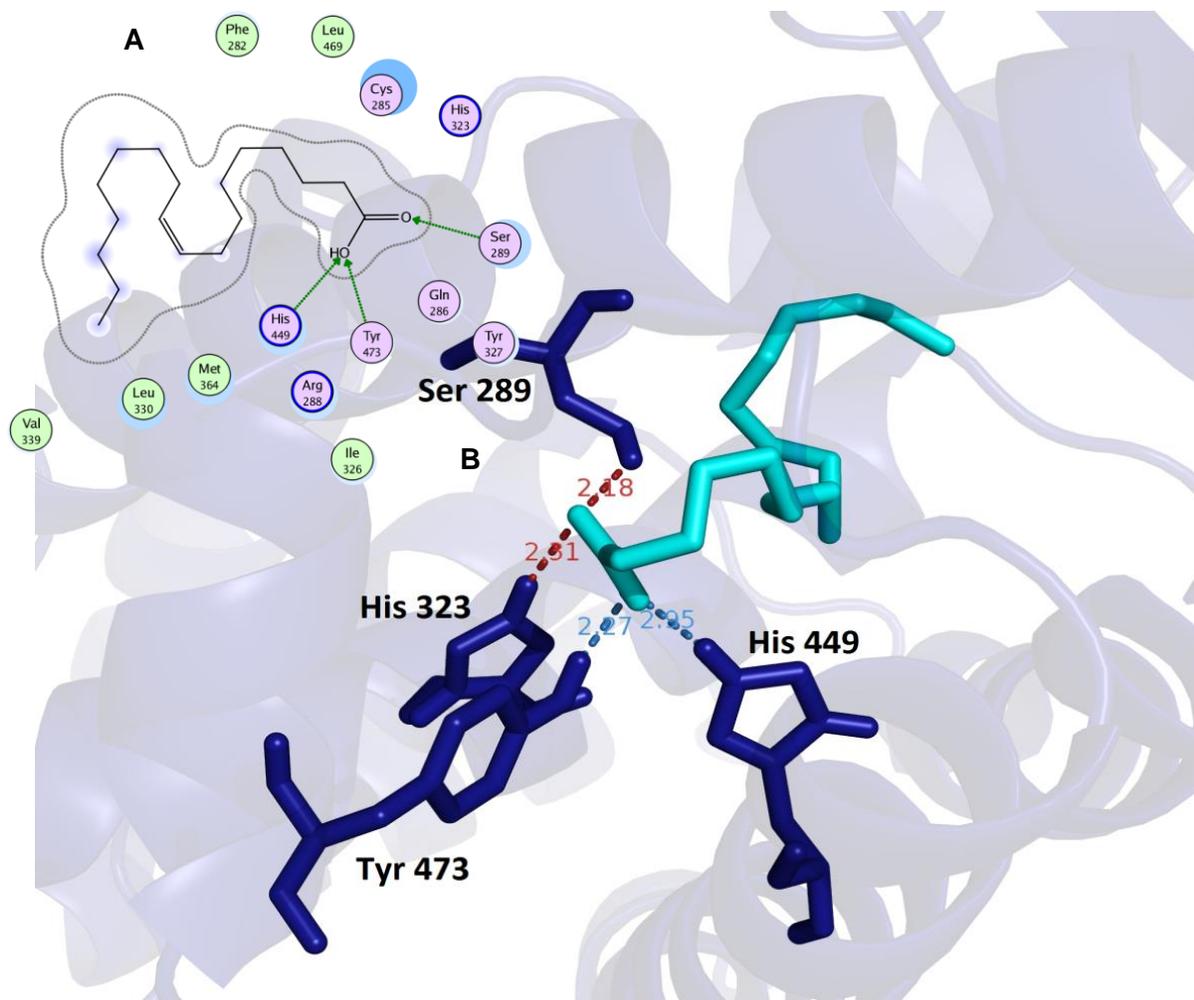
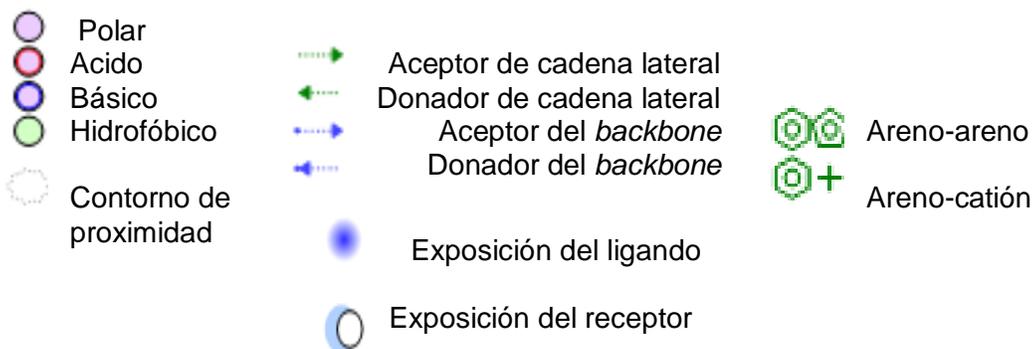


Figura 10. Interacciones entre el PPAR γ con AO después del *docking*. **A** Mapa de contacto 2D obtenido del ligando con las interacciones formadas con Ser 289, Tyr 473, e His 449. **B** Estructura tridimensional de PPAR γ con AO en el sitio de unión al ligando con distancias menores a 4Å.



6.3.1.3 Validación del método para la isoforma gamma con agonistas exógenos

Para la interacción de la proteína con los agonistas exógenos (Pioglitazona, GW1929), la validación se llevó a cabo con Rosiglitazona. Un agonista específico para PPAR- γ . Se tomaron los mismos parámetros que en el caso anterior.

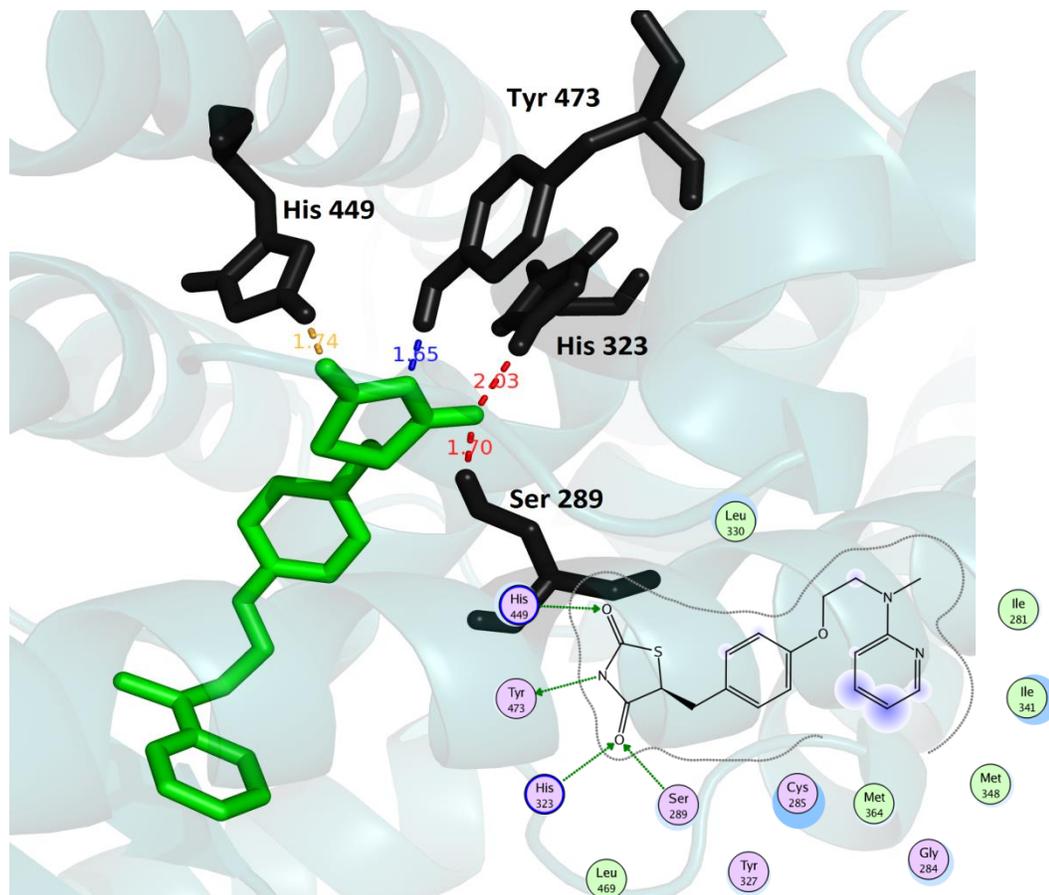
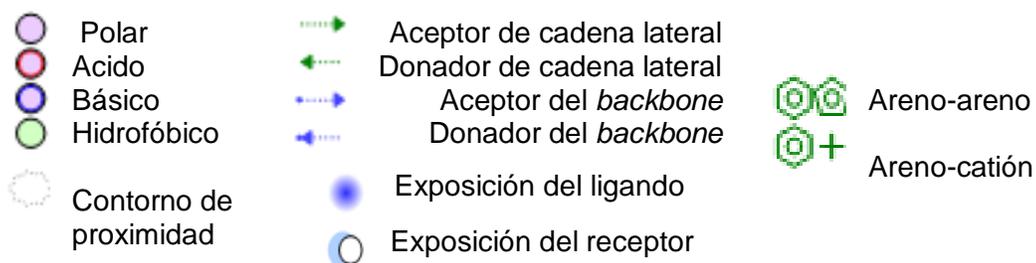


Figura 11. Interacciones entre el PPAR γ con Rosiglitazona después del *docking*. **A** Estructura tridimensional de PPAR γ con Rosiglitazona en el sitio de unión al ligando con distancias menores a 4Å. **B** Mapa de contacto 2D obtenido del ligando con las interacciones formadas con Ser 289, His 323, His 449 y Tyr 473.



6.3.1.4 Docking PPAR- γ con Pioglitazona y GW1929

En la Figura 11 y 12 se encuentran las interacciones de PPAR- γ con las glitazonas. Rosiglitazona interactúa con Ser 289, His 323, His 449 y Tyr 473, formando puentes de hidrógeno con el OH y nitrógeno de la tiazolidinediona. Por su parte la Pioglitazona sólo formó un puente de hidrógeno con His 323.

Cuadro 6. Propiedades de los modelos de interacción PPAR- γ + Rosiglitazona.

Modelo	Afinidad	Distancia de RMSD l.b.	Distancia de RMSD u.b.
1	-8.3	0.000	0.000
2	-8.0	1.872	2.391
3	-7.9	2.857	8.061
4	-7.7	2.511	3.602
5	-7.6	2.185	2.879
6	-7.5	3.029	8.358
7	-7.4	2.474	3.496
8	-7.4	2.803	8.234
9	-7.2	2.592	3.540

RMSD l.b.- low bound

RMSD u.b. upper bound

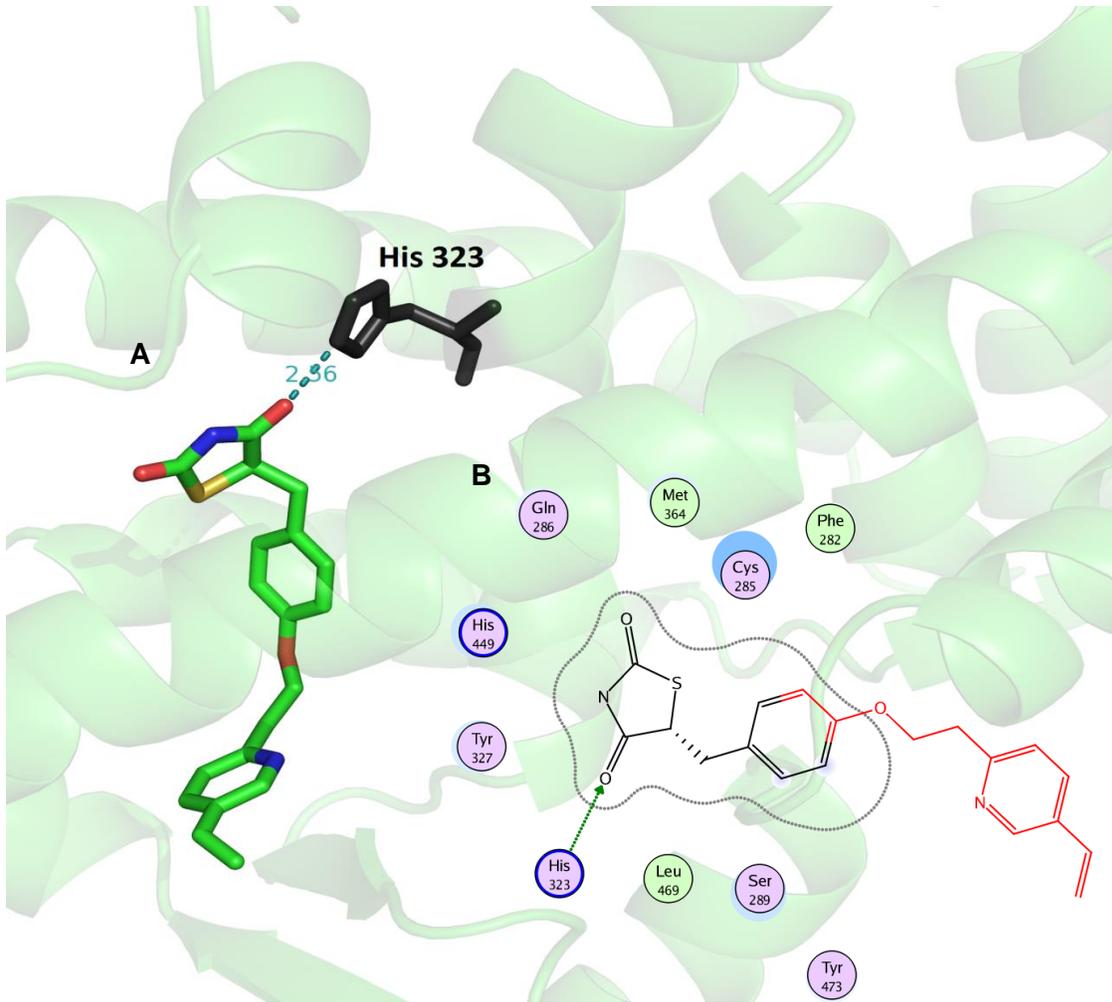
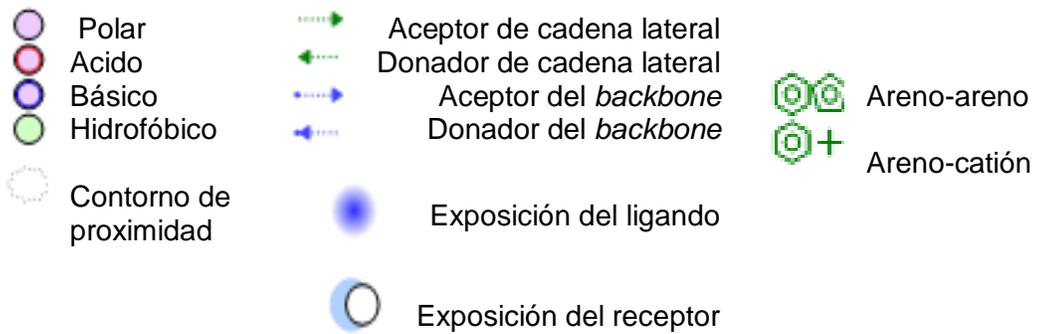


Figura 12. Interacciones entre el PPAR γ con Pioglitazona después del *docking*. **A** Estructura tridimensional de PPAR γ con Pioglitazona en el sitio de unión al ligando con distancias menores a 4Å. **B** Mapa de contacto 2D obtenido del ligando con la interacciones formada con His 323.



De estos acoplamientos se obtuvieron nueve conformeros, para Rosiglitazona el mejor ΔG de afinidad fue de -8.3 kcal/mol y para Pioglitazona de -8.1 kcal/mol como se describe en los cuadros 7 y 8 presentando mayor afinidad la Rosiglitazona.

Cuadro 7. Propiedades de los modelos de interacción de PPAR- γ + Pioglitazona.

Modelo	Afinidad	Distancia de RMSD l.b.	Distancia de RMSD u.b.
1	-8.1	0.000	0.000
2	7.8	3.226	8.204
3	-7.5	2.173	3.000
4	-7.4	3.154	8.741
5	-7.2	3.048	8.803
6	-7.2	3.474	8.771
7	-7.1	2.147	2.688
8	-7.0	3.599	8.982
9	-7.0	4.370	7.662

RMSD l.b.- low bound

RMSD u.b. upper bound

En la Figura 13 se muestra la interacción de PPAR- γ con GW1929 formando dos puentes de hidrógeno con los aminoácidos Tyr 327 y Ser 289, por otra parte se formó una interacción catión- π con la His449. El ΔG del mejor conformero fue de -9.4 kcal/mol de los 7 conformeros obtenidos (cuadro 8).

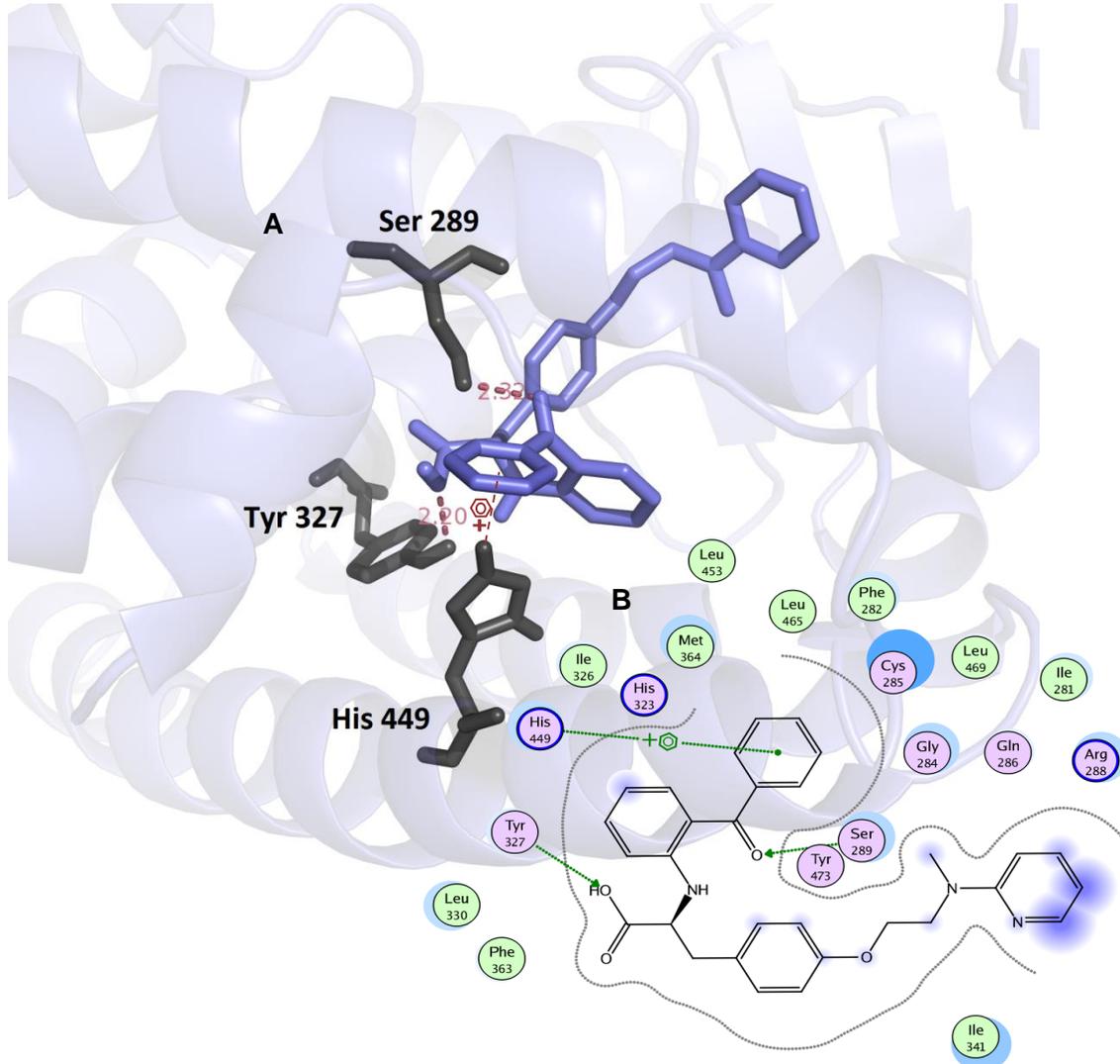
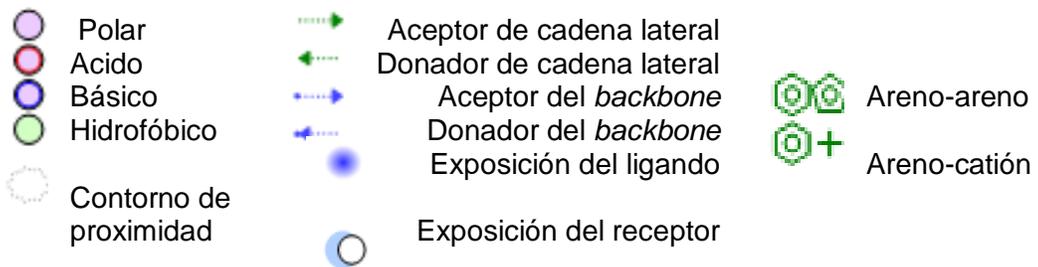


Figura 13. Interacciones entre el PPAR γ con GW1929 después del *docking*. **A** Estructura tridimensional de PPAR γ con GW1929 en el sitio de unión al ligando con distancias menores a 4Å. **B** Mapa de contacto 2D obtenido del ligando con la interacciones formada con His 449, Tyr 327 y Ser 289.



Cuadro 8. Propiedades de los modelos de interacción PPAR- γ + GW1929.

Modelo	Afinidad	Distancia de RMSD I.b.	Distancia de RMSD u.b.
1	-9.4	0.000	0.000
2	-8.9	1.928	4.176
3	-8.8	1.019	1.538
4	-7.3	1.927	8.732
5	-7.1	2.048	4.139
6	-6.8	2.033	9.115
7	-6.4	2.217	8.647

RMSD I.b.- low bound

RMSD u.b. upper bound

6.3.1.5 Validación del método para PPAR β/δ

La validación para la isoforma β/δ se llevó a cabo con el ligando endógeno GW501516 del cual se observan en la Figura 14. El programa Autodock Vina arrojó nueve confórmeros pero el de mejor afinidad tuvo un ΔG de -7.9 Kcal/mol (Cuadro 9).

Cuadro 9. Propiedades de los modelos de interacción PPAR β/δ + GW501516.

Modelo	Afinidad	Distancia de RMSD I.b.	Distancia de RMSD u.b.
1	-7.9	0.000	0.000
2	-7.8	6.294	10.060
3	-7.5	5.797	9.376
4	-7.5	5.590	9.025
5	-7.4	4.100	5.397
6	-7.1	6.458	10.116
7	-7.1	3.951	5.284
8	-6.9	5.136	8.160
9	-6.8	5.894	9.553

RMSD I.b.- low bound

RMSD u.b. upper bound

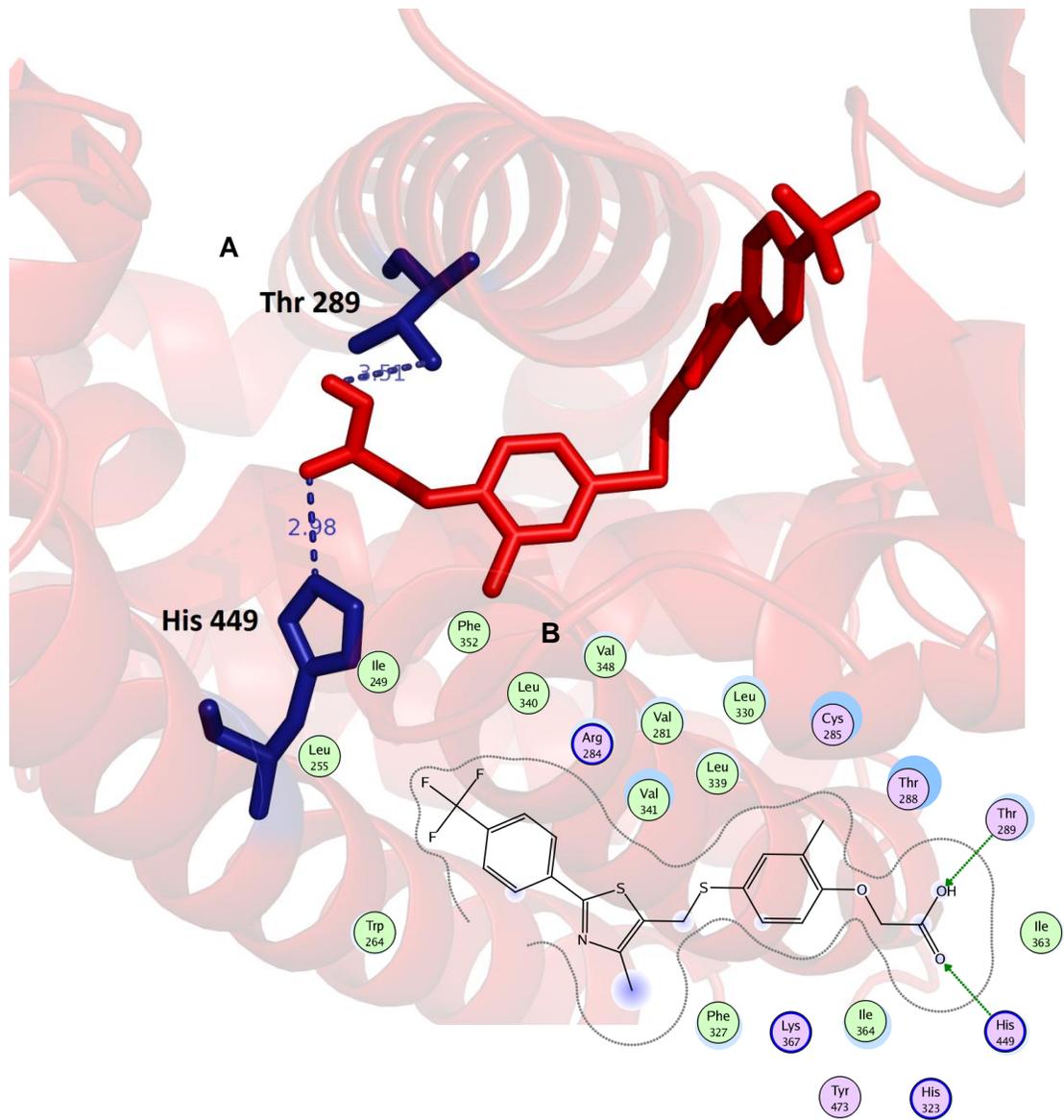
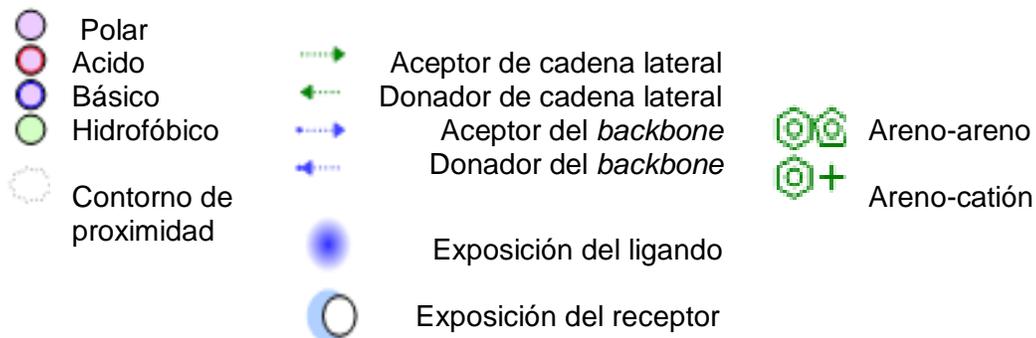


Figura 14. Interacciones entre el PPAR β/δ con GW501516 después del *docking*. **A** Estructura tridimensional de PPAR γ con GW501516 en el sitio de unión al ligando con distancias menores a 4Å. **B** Mapa de contacto 2D obtenido del ligando con la interacciones formada con His 449 y Thr 289.



Las interacciones producidas por la interacción de PPAR β/δ con su ligando específico GW501516 se encuentran en 2 aminoácidos (His 449 y Thr 289) formando 2 puentes de hidrógeno con la parte polar del ligando. En cuanto al acoplamiento con L-165041 se observan interacciones con 2 aminoácidos (Thr 289 e His 449)(Figura 15) y de éste se tuvieron 9 conformeros de los que el de mejor afinidad obtuvo un ΔG de -7.0Kcal/mol.

Cuadro 10. Propiedades de los modelos para la interacción PPAR β/δ + L-165041.

Modelo	Afinidad	Distancia de RMSD I.b.	Distancia de RMSD u.b.
1	-7.0	0.000	0.000
2	-6.7	2.643	4.486
3	-6.7	2.682	9.422
4	-6.5	2.024	8.839
5	-6.5	2.542	4.532
6	-6.5	2.329	4.529
7	-6.5	1.780	3.957
8	-6.5	2.509	9.053
9	-6.5	2.266	9.273

RMSD I.b.- low bound

RMSD u.b. upper bound

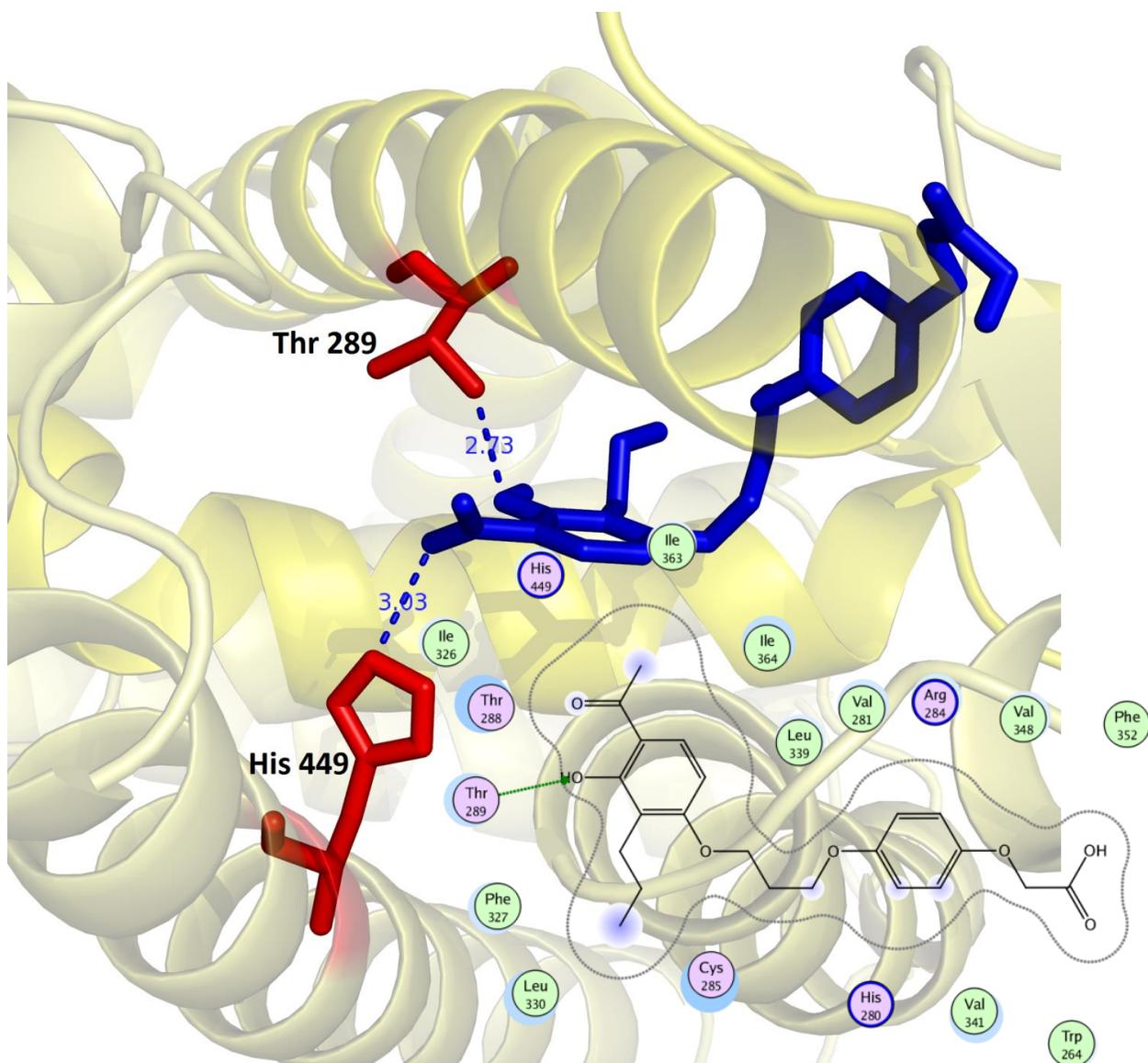
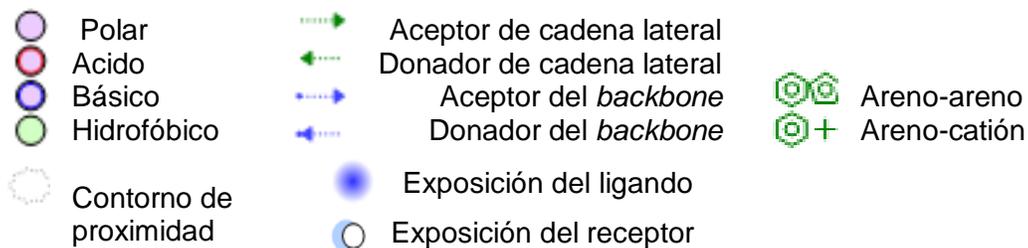


Figura 15. Interacciones entre el PPAR β/δ con L-165041 después del *docking*. **A** Estructura tridimensional de PPAR γ con GW501516 en el sitio de unión al ligando con distancias menores a 4Å. **B** Mapa de contacto 2D obtenido del ligando con las interacciones formada con His 449 y Thr 289.



En el cuadro 11 se hizo la recopilación de los datos importantes obtenidos en el estudio de acoplamiento molecular, observando que el GW1929, agonista específico para la isoforma gamma obtuvo el mejor ΔG de afinidad, es decir, el de menor energía. Aunado a ello se distingue que las interacciones con los aminoácidos del receptor PPAR tanto de la isoforma γ como la β/δ coinciden en el aminoácido His449 y la Ser289 o Thr289, los cuales participan en la mayoría de los acoplamientos

Cuadro 11. Interacciones y ΔG de afinidad de los agonistas para PPARs.

PPAR	Ligando	ΔG (Kcal/mol)	Interacciones
$\gamma, \beta/\delta$	EPA	-7.1	Ser 289, His 323, His 449, Tyr 473
$\gamma, \beta/\delta$	AO	-5.8	Ser 289, His 449, Tyr 473
γ	Pioglitazona	-8.1	His 323
γ	GW1929	-9.4	Ser 289, His 449, Tyr 327.
β/δ	GW501516	-7.9	His 449 y Thr 289
β/δ	L-165041	-7.0	His 449 y Thr 289

6.4 Interpretación de resultados conjuntos de los modelos neuroquímico (*in vivo*) e *in silico*

Una vez que se concluyeron los experimentos en el modelo neuroquímico y los estudios *in silico*, como se muestra en el Cuadro 12, se realizó una comparación de manera cualitativa, demostrando que la administración de todos los agonistas específicos (Pioglitazona, GW1929, L-165041 y GW501516) y no específicos (EPA y AO), que se utilizaron en el modelo neuroquímico previenen el daño producido por el AQ, aunque se observó que la afinidad de menor energía de unión fue por parte del agonista específico

para la isoforma γ . Sin embargo, para seguir explorando el mecanismo y tomando en cuenta que tanto la isoforma γ como la β/δ están participando, la comparación nos arrojó que hubo una preferencia en la mayor parte de las pruebas por la activación de isoforma β/δ (Cuadro 13).

Cuadro 12. Comparación cualitativa de los efectos conductuales y bioquímicos estudiados bajo el tratamiento de los agonistas para PPARs.

Parámetro a estudiar	Comparación de los efectos de los distintos tratamientos. Ordenados de mayor a menor.
Conducta	(GW1929=PGZ=L-165041)>GW501516>EPA>AO
GABA	(L-165041=GW501516)>(OA=EPA)>GW1929>PGZ
EROs	L-165041>EPA>OA>PGZ>GW1929
PL	EPA=OA>L-165041>GW501516>PGZ>GW1929
Docking	GW1929>PGZ>GW501516>EPA>AO

Cuadro 13. Comparación cualitativa de los efectos conductuales y bioquímicos estudiados considerando las isoformas de PPAR como blanco farmacológico.

Prueba	Resultado
Conducta	PPARγ>PPARβ/δ> PPAR-γ y β/δ
GABA	PPARβ/δ> PPAR-γ y β/δ>PPARγ
EROs	PPARβ/δ>PPAR-γ y β/δ>PPARγ
PL	PPARβ/δ-γ, >PPARβ/δ>PPARγ
Docking	PPARγ>PPARβ/δ>PPAR-γ y β/δ

Apoyando la elección de agonistas específicos para PPAR β/δ en los experimentos posteriores, Aleshin y cols. en el 2013, propusieron un mecanismo de acción de las tres isoformas para PPARs. Este mecanismo consiste en una regulación transcripcional y de expresión de los PPARs por parte de la isoforma β/δ , que retroalimenta tanto a la isoforma α como a la γ ; no obstante, en cuanto a la isoforma γ se retroalimenta con la β/δ

pero no con la α . Por otro lado la isoforma α no se retroalimenta con ninguna de las otras isoformas.

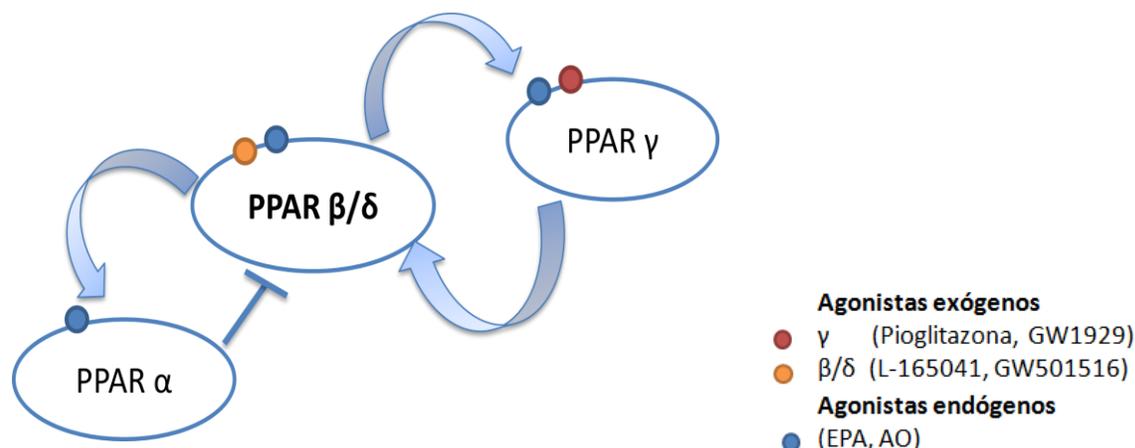


Figura 16 Diagrama de la triada de PPARs. PPAR β/δ regula la expresión de la isoforma de PPAR α y a la isoforma γ , al ser activada por ligandos endógenos o exógenos. Tomado y modificado de Aleshin *et al.*, 2013

De acuerdo a la información recabada, en la realización del protocolo con el modelo neuroquímico y los diferentes pretratamientos de los agonistas PPARs, se eligió el agonista L-165041 para cumplir con los objetivos posteriores (IV y V).

6.5 Resultados del objetivo IV

Para cumplir con el objetivo IV, se empleó el modelo transgénico R6/1 para la EH, con dos finalidades probar el agonista con mayor efectividad neuroprotectora y poder dilucidar en parte el mecanismo neuroprotector del agonista a nivel mitocondrial. Se utilizó el agonista L-165041 icv como tratamiento específico para PPAR β/δ , después de dicho tratamiento se realizaron pruebas conductuales que consisten en: 1. Observación de la presencia de “*Feet clasping*”; 2. Cuantificación de los movimientos horizontales y verticales; 3. Prueba de rotarod.

En la primera prueba, como se observa en el cuadro 14, a las 11 semanas no se presentó *feet clasping*, a las 24 y 35 semanas los animales lo presentaron sin ningún cambio entre los grupos, por lo que el tratamiento con el agonista para PPAR β/δ no modificó el fenotipo motor que se presenta alrededor de las 20 semanas de edad.

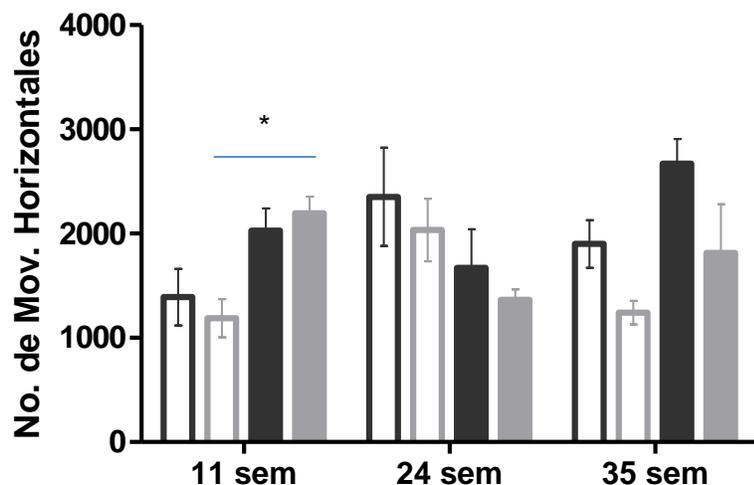
Cuadro 14. Evaluación del “*feet clasping*” de animales transgénicos (HTT) y *Wild type* (Wt) tratados con L-165041 a 11, 24, 35 semanas de edad.

Edad	Grupo	Presenta “Feet clasping”	No. de animales
11 semanas	Wt +V	No	6
	HTT+V	No	7
	Wt + F	No	7
	HTT+F	No	7
24 semanas	Wt + V	Si	6
	HTT+V	Si	6
	Wt + F	Si	6
	HTT+F	Si	7
35 semanas	Wt + V	Si	6
	HTT+V	Si	7
	Wt+F	Si	6
	HTT+F	Si	6

En cuanto a la segunda prueba, el conteo de movimientos horizontales y verticales llevada a cabo en el equipo Opto-Varimex, en el que se muestra (Figura 17) los grupos de ratones transgénicos de 11, 24 y 35 semanas (HTT+Veh, administrados con vehículo y HTT+F, administrados con fármaco y vehículo) y ratones *wild type* (Wt+Veh, administrados con vehículo y Wt+F, administrados con fármaco y vehículo) de las mismas edades. En cuanto al conteo de movimientos horizontales (Figura 17A) hubo cambios significativos en el grupo transgénico tratado con el agonista específico para PPAR β/δ (L-165041) respecto al transgénico tratado con vehículo, a la edad de 11 semanas.

Con relación al conteo de movimientos verticales (Figura 17B), se puede observar que hay una disminución notable entre los grupos Wt y HTT (tratados con vehículo y fármaco) en general, y se ve una tendencia en el aumento del grupo transgénico tratado con el fármaco con respecto al basal.

A



B

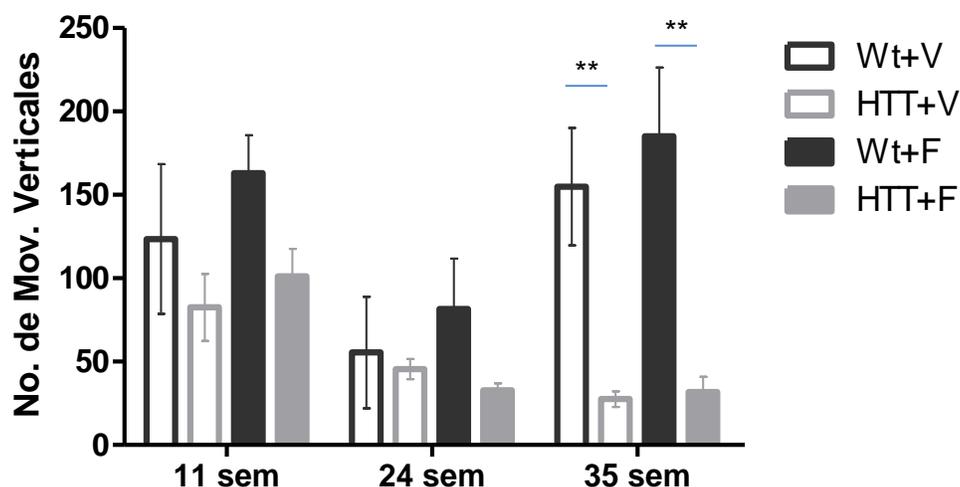
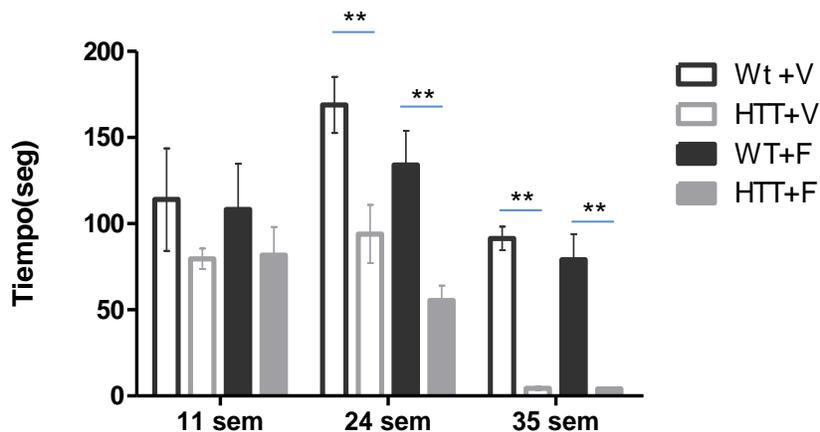


Figura 17. Actividad motora espontánea de 11, 24 y 35 semanas de edad. **A.** Conteo de movimientos horizontales combinados de los ejes x y y. **B.** Conteo de movimientos verticales del eje z. Los valores representan el promedio \pm el error estándar de seis animales por grupo * $p < 0.05$ vs. HTT+V, ** $p < 0.01$ diferente a HTT+V, * $p < 0.05$ diferente a HTT+F. ANOVA de 2 vías seguido por Bonferroni.

En la figura 18 se aprecia la prueba de conducta de rotarod del grupo transgénico contra el grupo *Wild Type* de las tres edades evaluadas. En esta prueba se obtiene la latencia y la velocidad que tienen los animales a caer del rodillo giratorio. De estas pruebas se puede observar que a la edad de 11 semanas existe una variación de la velocidad pero

no del tiempo del grupo de ratones transgénicos tratados con el vehículo con respecto a los transgénicos tratados con el fármaco. Las edades de 24 y 35 semanas no sufrieron modificaciones, únicamente se observa que los grupos *wild type* tratados y sin tratamiento con el fármaco son diferentes al grupo transgénico y el daño locomotor es dependiente de la edad.

A



B

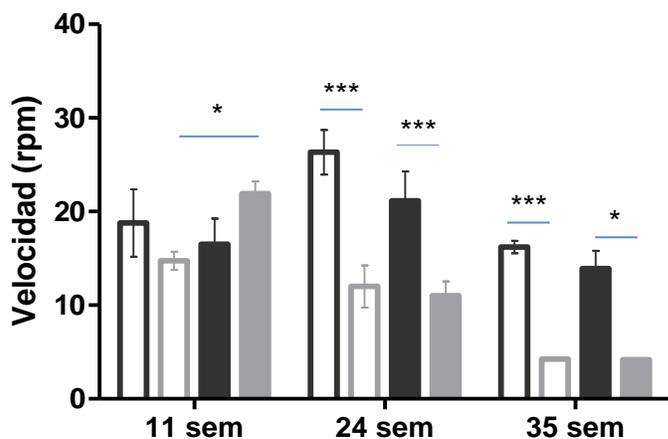


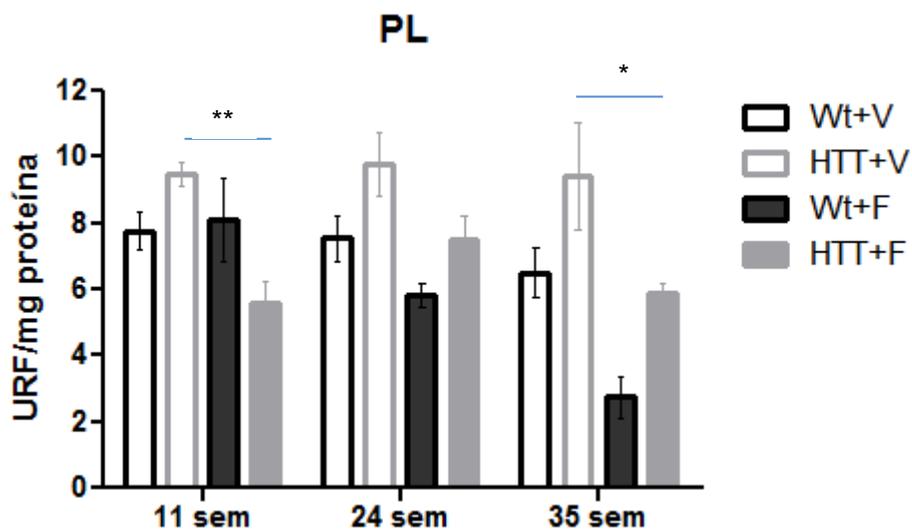
Figura 18. Actividad locomotora de 11, 24 y 35 semanas de edad. **A.** Latencia de ratones transgénicos R6/1 tratados con vehículo y con fármaco (L-165041). **B.** Velocidad en rpm de ratones transgénicos R6/1 tratados con vehículo y con fármaco(L-165041). Los valores representan el promedio \pm el error estándar de 6 animales por grupo.* $p < 0.05$ diferente a HTT+V, ** $p < 0.01$ diferente a HTT+V, *** $p < 0.001$ diferente a HTT+V. ANOVA de 2 vías seguido por Bonferroni.

Posteriormente se midieron las EROs formadas y la PL en la confirmación del efecto protector contra el daño oxidante de este agonista en un modelo transgénico R6/1 para la EH. Se observa en la Figura 19 que en la PL disminuye significativamente en los grupos transgénicos tratados con el fármaco (HTT+F) contra los transgénicos solo tratados con

vehículo (HTT +V) en la edad de 11 y 35 semanas pero a la edad de 24 semanas tiende a disminuir.

En cuanto a las EROs formadas se notó el decremento significativamente en los grupos transgénicos tratados con el fármaco (HTT+F) en relación a los transgénicos solo tratados con vehículo (HTT +V) a las tres edades evaluadas.

A



B

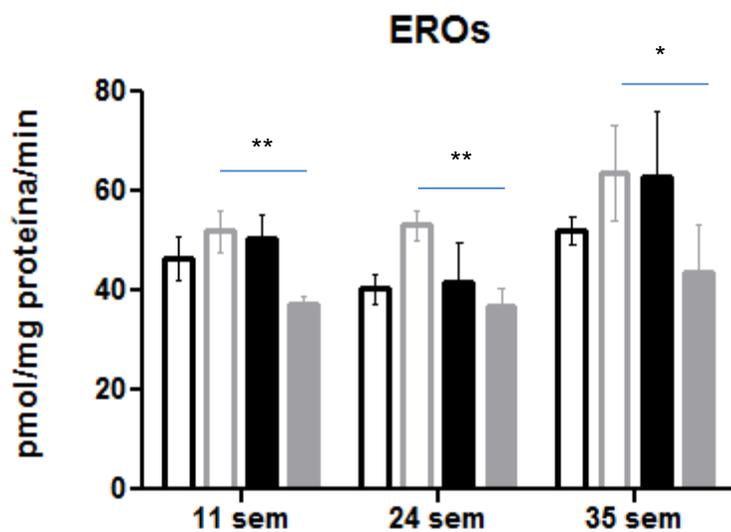


Figura 19. Evaluación del estrés oxidante en ratones transgénicos R6/1 y Wild Type de 11, 24 y 35 semanas de edad. **A)** Evaluación de la peroxidación de lípidos en estriado de ratones tratados con vehículo (PEG 200) y fármaco (L-165041) icv. **B)** Cuantificación de EROs en estriado de ratones tratados con vehículo (PEG 200) y fármaco (L-165041)

icv. Los valores representan el promedio \pm el error estándar de seis animales por grupo. * $p < 0.05$ diferente a HTT+V, ** $p < 0.01$ diferente a HTT+V. ANOVA de dos vías seguido por Bonferroni.

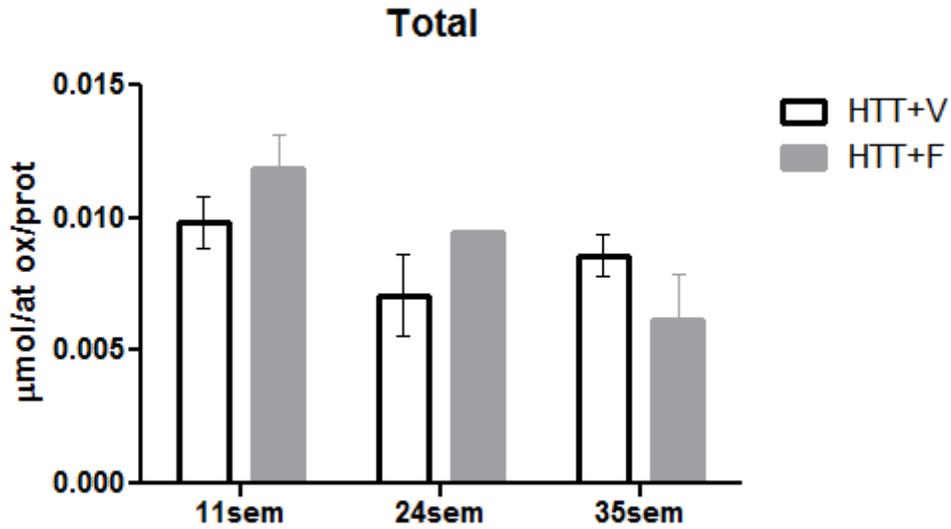
6.6 Resultados del objetivo V

Se evaluó la capacidad de respiración mitocondrial por consumo de oxígeno en un electrodo tipo Clark, en ratones R6/1 y Wild Type administrados con vehículo (PEG 200) y el agonista específico para PPAR δ/β (L-65041). Después del tratamiento y de la evaluación conductual se llevaron a cabo las pruebas de respiración aislando membranas enriquecidas de complejos mitocondriales del estriado.

Los resultados del consumo de oxígeno fueron expresados en μ moles de átomos de oxígeno consumidos por miligramo de proteína en un minuto, utilizando succinato como medio de reacción, se midió el estado 3 (estimulado con ADP) y el estado 4 del complejo I y II de la cadena de respiración mitocondrial (Figura 20), donde no se encontraron cambios estadísticamente significativos entre los grupos de ratones transgénicos administrados con vehículo respecto a los tratados con el agonista específico para la isoforma β/δ , no obstante en el estado 3 y 4 a las edades de 11 y 24 semanas se ve una tendencia en el incremento de consumo de oxígeno en los grupos de ratones transgénicos tratados con el fármaco respecto a los de vehículo.

En cuanto al complejo II (Figura 21) tanto en el estado 3 como en el estado 4 se reflejó un aumento en el consumo de oxígeno en ratones transgénicos administrados con el fármaco (HTT+F) con respecto a los que sólo fueron inyectados con vehículo (HTT+V). Se muestra una disminución del consumo dependiente de la edad por el deterioro causado.

A



B

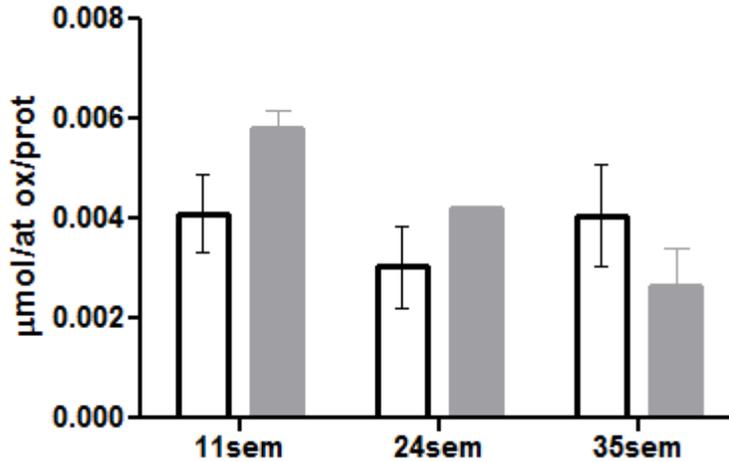
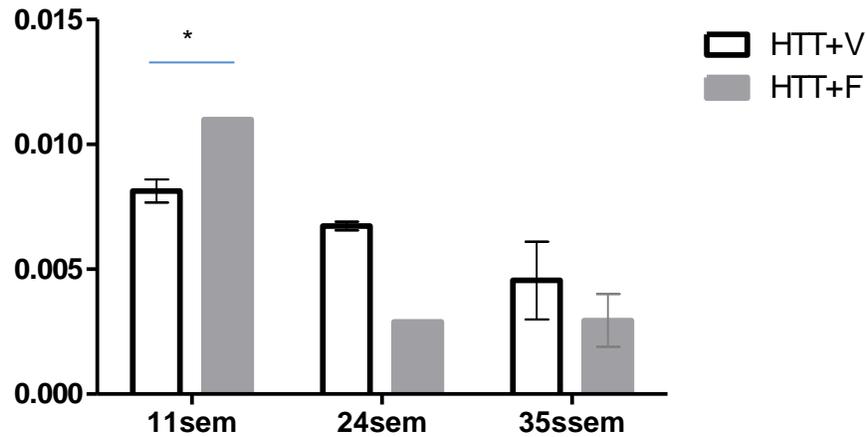


Figura 20. Consumo de oxígeno de complejo I y II de la cadena de respiración R6/1 y Wild type de 11, 24 y 35 semanas de edad. **A** Estado 3 del complejo I y II de ratones transgénicos tratados con vehículo y tratados con el fármaco (L-165041). **B** Estado 4 del complejo I y II de ratones transgénicos tratados con vehículo y tratados con el fármaco. Los valores representan el promedio \pm el error estándar de 6 animales por grupo. ANOVA de 2 vías seguido por Bonferroni.

A)



B

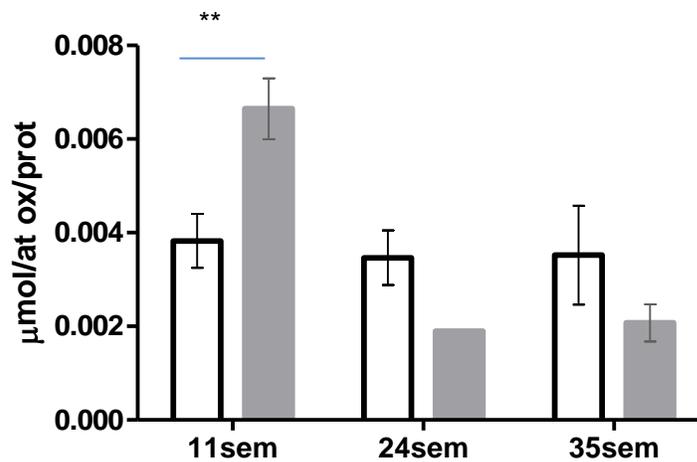


Figura 21. Consumo de oxígeno de complejo II de la cadena de respiración R6/1 y Wild type de 11, 24 y 35 semanas de edad. **A** Estado 3 del complejo I y II de ratones transgénicos tratados con vehículo y tratados con el fármaco. **B** Estado 4 del complejo I y II de ratones transgénicos tratados con vehículo y tratados con el fármaco. Los valores representan el promedio \pm el error estándar de seis animales por grupo. * $p < 0.05$ diferente a HTT+V, ** $p < 0.01$ diferente a HTT+V. ANOVA de dos vías seguido por Bonferroni.

7. Discusión

La activación de los PPARs ha sido ampliamente estudiada como blanco terapéutico en enfermedades neurodegenerativas incluyendo la EH (M. Chiang et al., 2010; Dickey et al., 2016; Iwashita & Muramatsu, 2007; Jin et al., 2013; Madrigal et al., 2007). El mecanismo neuroprotector mediado por la activación de estos receptores no ha sido descrito completamente, aunque si está reportado que el sistema antioxidante y el sistema antiinflamatorio están involucrados (Marion-Letellier, Savoye, & Ghosh, 2016).

En este trabajo los resultados que se obtuvieron en conjunto nos aportan información acerca de la participación de las isoformas de PPARs, la efectividad terapéutica de sus agonistas y nos amplía el panorama de los posibles mecanismos que están siguiendo para conferir neuroprotección en un modelo neuroquímico, transgénico de la EH y en estudios *in silico*.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la efectividad de la activación de los PPARs por sus agonistas. Los agonistas endógenos AO, EPA (no específicos) y los agonistas exógenos L-165041 y GW1929 (específicos para la isoforma de PPAR β/δ y PPAR γ respectivamente), empleados en este protocolo mostraron resultados favorables en los parámetros evaluados, usando el modelo neuroquímico y simulando su interacción *in silico*. Por otra parte, con el agonista PPAR β/δ (L-165041), empleando el modelo transgénico R6/1 para la EH, fue posible dilucidar una parte de su mecanismo neuroprotector como pretratamiento.

Los parámetros evaluados o cuantificados en el modelo neuroquímico fueron el conteo de número de giros ipsilaterales, los niveles del neurotransmisor GABA, la medición de EROs y PL especialmente en las pruebas de estrés oxidante (figuras 6 y 7) y la recuperación en los niveles del neurotransmisor GABA (Figura 5), disminuyendo la formación de EROs y la PL. La respuesta de los demás agonistas PPARs (Pioglitazona, GW501516), ante el daño producido en el modelo neuroquímico y evaluado en los mismos parámetros, fue igualmente neuroprotectora; sin embargo, su efecto fue menor a pesar de tener efecto positivo en la reducción de giros, así como en la recuperación en los niveles de GABA.

7.1 Propuesta de un mecanismo neuroprotector en los parámetros conductuales en el modelo neuroquímico.

Respecto a la disminución de los giros ipsilaterales y la recuperación en los niveles del neurotransmisor GABA se tienen reportes de que tratamientos con agonistas PPAR γ , como Rosiglitazona y agonistas de PPAR β/δ , favorecen el incremento en la expresión del BDNF (del inglés Brain-Derived Neurotrophic Factor) y la regulación de la actividad de su promotor (Benedetti *et al.*, 2014; Jin *et al.*, 2013; Kariharan *et al.*, 2015), el cual juega un papel importante en la sobrevivencia y diferenciación de neuronas GABAérgicas del estriado (Zuccato & Cattaneo, 2007). El BDNF se libera desde la neurona glutamatérgica cortical a la GABAérgica estriatal activando al receptor TrkB (del inglés tyrosine kinase B) en neuronas corticales y estriatales mejorando la activación de los receptores NMDA, desencadenando una vía de señalización de acuerdo a la tirosina fosforilada de una de sus subunidades. Además se tienen reportes de que en las neuronas corticales la activación de TrkB por la vía de Ras/Erks está regulando la transcripción de GAD65 que media la síntesis de GABA a partir de glutamato (Sánchez-Huertas & Rico, 2011). Por otra parte se sabe que la htt participa en el transporte vesicular y que está involucrada en el mejoramiento de la función de la conexión cortico-estriatal, favoreciendo así la transcripción de BDNF y promoviendo el transporte axonal y la liberación de vesículas que contengan BDNF. En la EH este factor neurotrófico se ve alterado (Saudou & Humbert, 2016), no obstante el empleo de agonistas de PPARs incrementa los niveles de BDNF y disminuye los agregados de HTTm (M. Chiang *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2013).

Tomando en cuenta todo lo anterior sugerimos que al incrementarse el BDNF debido a la activación de PPARs por sus ligandos, éste sea liberado desde la neurona cortical glutamatérgica hacia la neurona GABAérgica y active el receptor TrkB. Una vez activado, podría fosforilar a la tirosina 515 que sigue la vía Ras/Erks y regula la transcripción de GAD65, por medio del factor de transcripción CREB (del inglés cAMP response element-binding protein), o fosforila a la subunidad NR2B del receptor NMDA mejorando la transmisión sináptica (Figura 22). El BDNF también podría ser liberado de manera autocrina activando el TrkB encontrado en la misma célula cortical promoviendo la liberación del neurotransmisor glutamato (Zuccato & Cattaneo, 2007). Así, es posible que los agonistas empleados como pretratamiento, en este proyecto, están promoviendo preventivamente esta vía BDNF-TrkB. Esta propuesta de mecanismo es sólo es una de las posibles vías neuroprotectoras, ya que se observa un efecto dual de los mencionados

agonistas al prevenir paralelamente el daño oxidante, evidenciado por la medición de los niveles de EROs y PL.

Los agonistas exógenos mostraron un efecto mayor en la disminución de EROs que en la PL como se muestra en las figuras 6 y 7, probablemente debido a la promoción de la transcripción de enzimas antioxidantes como SOD y catalasa de las cuales se sabe están aumentadas con tratamientos de agonistas para PPARs como Rosiglitazona y Pioglitazona (Jung *et al.*, 2007; Serghides *et al.*, 2014). Aunque se requiere explorar con otras pruebas para demostrar cómo se encuentran expresadas SOD y catalasa en este modelo.

En cuanto al mecanismo de acción que siguen los diferentes agonistas PPARs, se sabe que los ácidos grasos (AO, EPA) y sus metabolitos actúan a nivel de la membrana lipídica (Morales-Martínez *et al.*, 2016), como atrapadores de radicales libres y a través de la activación de receptores como los PPARs o como los NRF1 y 2 (del inglés Nuclear Respiratory Factor) (M. C. Chiang, Chern, & Huang, 2012), los cuales regulan genes necesarios que participan en la respiración mitocondrial y además son coactivados por el PGC1- α (Scarpulla, 2002), estudiado ampliamente en la activación de los PPARs. Se tiene evidencia también que la señalización de los PUFAS, como EPA en conjunto con GPR40 (del inglés G protein-coupled receptor 40), contribuyen en estudios de neurogénesis, efectos antinociceptivos, efectos antiapoptóticos, en la homeostasis de Ca²⁺ en modelos enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer. Adicionalmente el grupo de Khan & He, (2017), han sugerido que AO y EPA están participando en la regulación de las vías de señalización de CREB para la expresión de BDNF.

Por lo tanto la activación de PPARs por los ácidos grasos sería una buena estrategia terapéutica preventiva para este tipo de padecimientos neurodegenerativos, ya que el resto de los agonistas mostraron un efecto mayor en cuanto a la reducción de EROs, éstos podrían estar actuando solo a nivel nuclear por medio de la señalización en comparación con los ácidos grasos, los cuales tienen la propiedad de ejercer un efecto a través de diferentes mecanismos.

7.2 Hallazgos en los estudios *in silico* en las interacciones con agonistas PPARs

Los estudios de acoplamiento molecular, aportaron información importante sobre las interacciones formadas, se reprodujo la metodología antes empleada por la validación realizando un *redocking*, es decir, un acoplamiento con los ligandos ya estudiados para estos receptores (DHA, Rosiglitazona y GW501516). En estas interacciones se formaron puentes de hidrógeno con Ser289, His323, Tyr473, e His449 con los grupos OH de los ligandos al igual que lo reportado por Zoete *et al.* (2007) para DHA, en el sitio de unión al ligando que encuentra en una cavidad en forma de Y con una entrada y dos huecos: el brazo I que se extiende hacia la hélice H12 en el dominio AF-2, y el brazo II, situado entre la hélice H3 y la hoja β .

Una vez validado el método, se realizó el acoplamiento de la isoforma de PPAR γ con EPA, AO, GW1929 y Pioglitazona, y para la isoforma de PPAR β/δ con L-165041 y GW501516 obteniendo el ΔG de afinidad que nos parametriza la energía requerida para la unión entre el receptor con su ligando, siendo la de menor energía la unión más fuerte. Se formaron puentes de hidrógeno en el grupo carboxilato de los ácidos grasos (EPA, DHA, AO) con Ser289, His323, His449, Tyr473 con ΔG alrededor de -7.0kcal/mol; sin embargo, el ligando con la unión más fuerte fue GW1929, agonista específico para PPAR γ , con un ΔG de -9.4kcal/mol (Cuadro 11), debido a la formación de tres interacciones importantes con Ser289, His449, Tyr327, formando puentes de hidrógeno con Ser289 y Tyr 327. Adicionalmente, se formó una interacción catión- π entre las cadenas laterales de la His449 y un benceno del ligando, estos aminoácidos han sido reportados como aminoácidos conservados en la isoforma γ y la β/δ de PPARs. Asimismo, estos aminoácidos junto con la His323 forman parte de la red de puentes de hidrógeno con los grupos polares del brazo I del receptor (ver Figura 23)

(ver Figura 23) (Zoete *et al.*, 2007).

En conjunto la evidencia proporcionada con estos acoplamientos, nos aportan información sobre las partes estructurales imprescindibles de los ligandos para PPARs, esto es, la región de grupos polares que se acopla al brazo I del receptor; un claro ejemplo son los ácidos grasos que poseen en su estructura el grupo carboxilato en los primeros cuatro átomos de carbono. En 2008 el grupo de Gani & Sylte, comprobó que los PPARs con el heterodímero del receptor ácido retinoico (RXR) se unen con gran afinidad a los primeros átomos de carbono del DHA los cuales pertenecen al grupo carboxilato. Otra parte

importante que debe conformar la estructura del ligando es la cola hidrofóbica, la cual se acopla al brazo II del receptor.

7.3 Fortalecimiento de una hipótesis: hallazgos conjuntos de modelos neuroquímico e *in silico*

El modelo neuroquímico y el acoplamiento molecular nos proporcionó información para identificar los posibles residuos claves en el receptor PPAR para una mejor interacción con sus ligandos. Además, propusimos un mecanismo (vía BDNF-TrkB) por el cual la activación de estos receptores se lleva a cabo.

7.4 Búsqueda del mecanismo protector del agonista PPAR β/δ en el modelo transgénico

Para continuar con el estudio de los efectos de estos agonistas de PPARs, se utilizó el modelo transgénico R6/1 con uno de los tratamientos anteriores, si bien todos tuvieron un efecto bueno en las pruebas evaluadas, se eligió uno en base a la ubicación funcional de todas las isoformas. En 2013, el grupo de Aleshin hizo una recopilación de los datos más relevantes relacionados con los efectos neuroprotectores que proporcionaban las tres isoformas de PPAR. De manera interesante la isoforma β/δ tiene un papel muy importante al incrementar los niveles de las isoformas α y γ ; esta retroalimentación no se da por la activación ni de α ni γ , sino por un sistema indirecto de activación modelado por una triada de PPARs, por lo tanto se eligió el agonista L-165041 específico para PPAR β/δ .

En la segunda parte de este proyecto se utilizó un ratón transgénico debido a las características que presenta, las cuales están ligadas a alteraciones causadas en la HTTm. En este modelo de la EH, son importantes las evaluaciones de pruebas conductuales (revisión de *feet clasping*, conteo de movimientos horizontales y verticales, prueba de rotarod) que nos hablan del fenotipo motor reflejado por los diferentes grupos control y los tratamientos.

Los resultados obtenidos con el modelo transgénico R6/1 nos muestran que, posterior al pretratamiento con el agonista PPAR β/δ , no hubo diferencias en la presencia de *feet clasping* a la edad de 24 y 35 semanas, no así en los ratones de 11 semanas que no lo presentaron (Cuadro 14). Posiblemente el pretratamiento de una semana no es suficiente para que se refleje un cambio en el fenotipo, o para que se retarde la aparición de éste. Los movimientos horizontales y verticales proporcionan información sobre el comportamiento motor espontáneo en campo abierto, con el pretratamiento del agonista PPAR β/δ , hubo cambios a la edad de 11 semanas, donde se aumentan los movimientos horizontales significativamente con respecto al transgénico tratado con vehículo (Figura 17); sin embargo, en los movimientos verticales no se detectaron cambios. Por último se hicieron pruebas de rotarod evaluando la coordinación motora y el equilibrio y a las 11 semanas se ve un cambio en el aumento de velocidad de los ratones R6/1 tratados con el fármaco (Figura 18). En todas estas pruebas conductuales se ve una modificación en la conducta del animal a edad temprana (11semanas); no obstante, la administración del fármaco no recupera este fenotipo a las 24 semanas. Por lo que tal vez sea necesario que en el ratón transgénico R6/1, a partir de las 11 ó 15 semanas de edad se administre el fármaco agonista PPAR β/δ , en diferentes periodos de tiempo, y se realice un seguimiento tanto conductual y de actividad motora, para detectar algún cambio o retardo en la aparición de los síntomas. Así como lo realizó el grupo de Dickey (2016) pero en otra línea de ratones transgénicos para la EH. Está reportado que la aparición de defectos motores comienzan alrededor de las 18 semanas de edad (Hodges *et al.*, 2008) n el modelo R6/1 por lo que a las 11 semanas no hay disminución en latencia y velocidad entre los grupos transgénicos y wild type pero la velocidad incrementa con el tratamiento.

Según lo reportado previamente por Pérez-Severiano y cols. en el 2000, ratones transgénicos R6/1 presentan un alto daño oxidante a las 24 y 35 semanas de edad. En nuestros grupos experimentales tratados con el agonista de PPAR, la lipoperoxidación disminuyó significativamente a la edad de 11 y 35 semanas, y a pesar de que los cambios a las 24 semanas no fueron estadísticamente significativos hubo una tendencia a disminuir. Adicionalmente, la cuantificación de las EROs formadas a las 11, 24 y 35 semanas decreció en los grupos tratados con L-165041 con respecto a los tratados con vehículo; por lo que el tratamiento pudo modificar el estrés oxidante dependiendo del deterioro correspondiente a cada edad.

En cuanto a la edad de 35 semanas, la degeneración neuronal está muy avanzada y es prácticamente imposible revertir el daño o proteger a las neuronas sobrevivientes, aunque disminuya tanto EROs como PL no se presenta un mejoramiento que se refleje en el fenotipo.

7.5 Modelo transgénico R6/1 y la respuesta mitocondrial ante el pretratamiento con el agonista PPAR β/δ

Por otra parte se evaluó la capacidad de respiración mitocondrial de ratones transgénicos R6/1, donde se ve una modificación en el estado 3 (estimulado con ADP) y el estado 4 en el complejo II de la cadena de respiración a las edad de 11 semanas. En este modelo R6/1 no se encontró alterado este parámetro a la edad de 24 y 35 semanas. Existe evidencia de que el complejo II está disminuido en pacientes con la EH (Browne *et al.*, 1997; Gu *et al.*, 1996), aunado a esto, Damiano y cols. (2013) encontraron alterado este complejo en el modelo R6/1 a las 16 semanas de edad, lo que corresponde con nuestros datos. Nosotros encontramos una disminución en el consumo de oxígeno por parte del complejo II que es dependiente de la edad en el ratón.

En el modelo de ratón transgénico R6/1 para la EH se encontró un efecto neuroprotector por parte del agonista PPAR β/δ . Observamos disminución en el estrés oxidante y en prevención en las alteraciones motoras, así como modificaciones en la respiración mitocondrial a edad temprana. Por lo que se puede sugerir que este agonista PPAR β/δ está participando en la prevención del daño de vía mitocondrial que está afectada por la formación de agregados de HTT^m, por lo que reiteramos la propuesta de hacer un seguimiento desde las 11 o 15 hasta antes las 24 semanas para medir otros parámetros que expliquen el mecanismo de la activación de estos receptores.

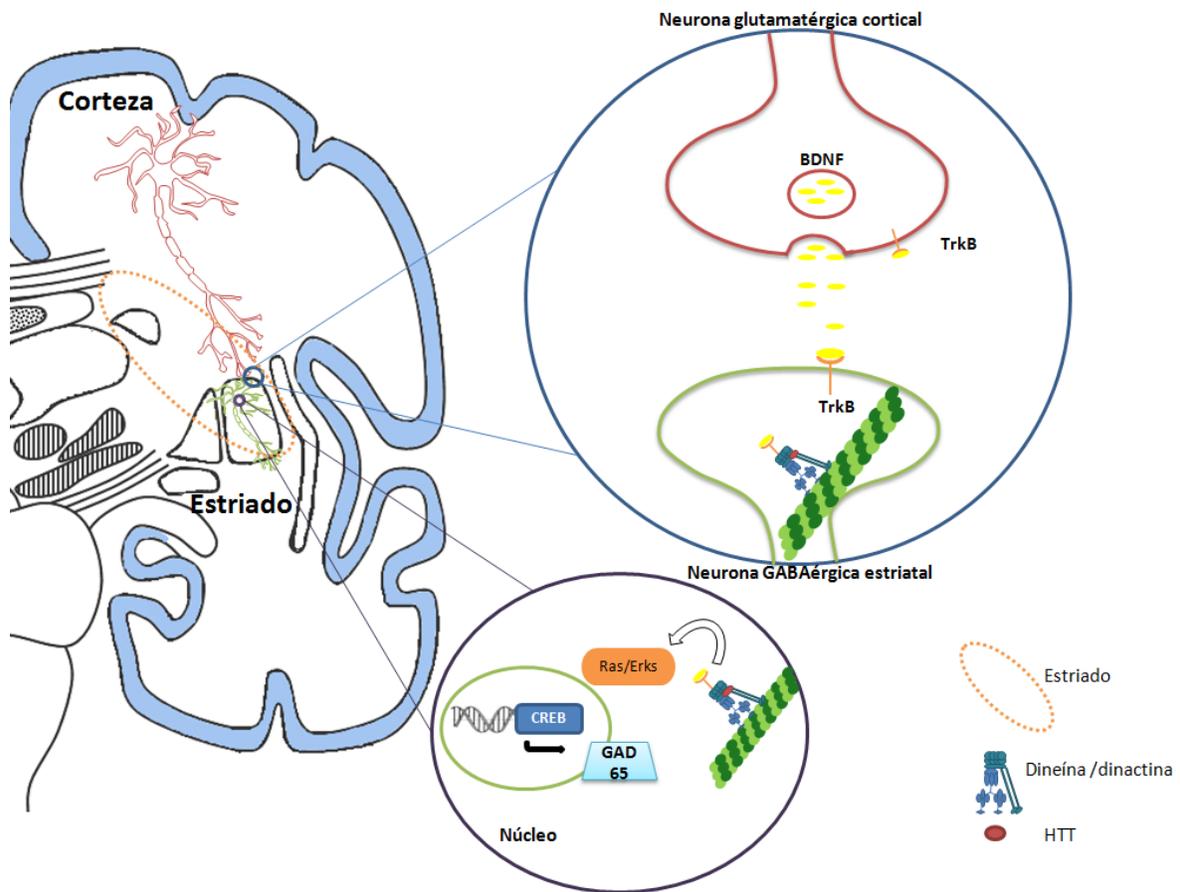
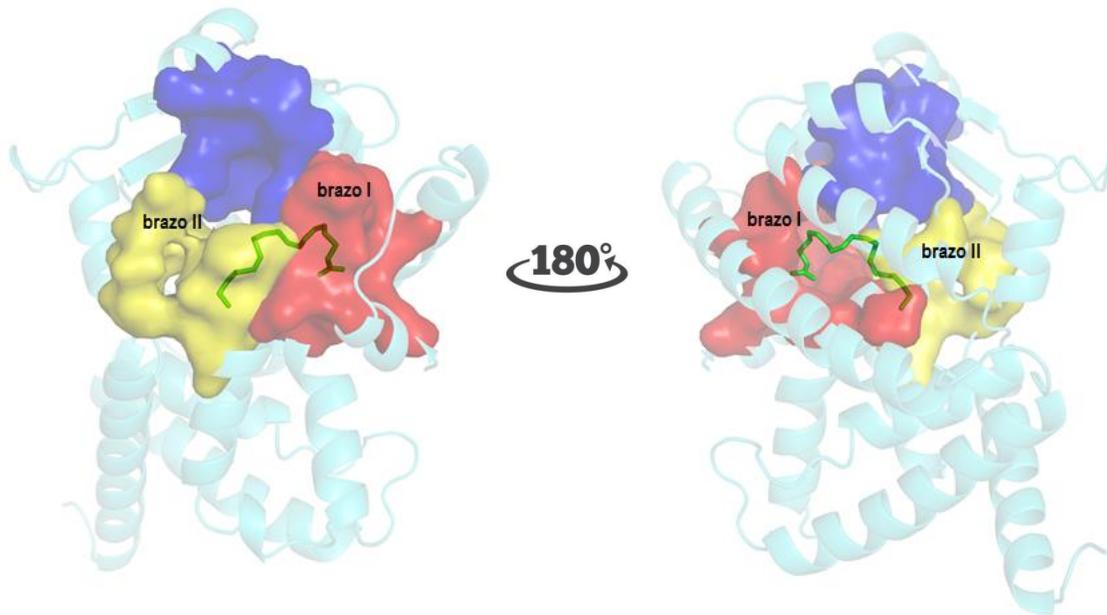


Figura 22. Activación de PPARs promueve la vía BDNF-TrkB. (Modificado de Saudou & Humbert, 2016).



Residuos del Brazo I:

PPAR β/δ

Phe 282
Cys285
Gln286
Thr289
His 323
Phe327
Ile326
Ile363
His449
Met453
Leu469
Tyr473

PPAR γ

Phe282
Cys285
Gln286
Ser289
His323
Tyr327
Ile326
Phe363
His449
Leu453
Leu469
Tyr473

Residuos del Brazo II:

PPAR β/δ

Ile249
Leu255
Glu259
Trp264
Val281
Arg284
Leu339
Val341
Val348
Phe352
Leu353
Ile364

PPAR γ

Ile249
Leu255
Glu259
Phe264
Ile281
Gly284
Val339
Ile341
Met348
Phe352
Leu353
Met364

Figura 23. Sitio de unión al ligando de PPARs. Brazo I(rojo), es una cavidad polar, mientras que la entrada(azul) y el brazo II (amarillo) son principalmente hidrofóbicas.(Modificado de Zoete et al., 2007)

8. Conclusiones

1. Todos los agonistas PPARs probados en el presente estudio muestran un efecto neuroprotector en los parámetros evaluados.
2. El efecto neuroprotector mayor frente al daño producido por AQ es de GW1929 (20mg/kg) y de L-165041 (10mg/kg).
3. Los grupos tratados con EPA, AO y L-165041 presentan el mejor efecto antioxidante con respecto al resto de los agonistas.
4. Las interacciones de los agonistas con PPAR- γ son altamente similares entre ellos obteniendo interacciones con los mismos residuos.
5. El agonista GW1929 presenta la mayor afinidad con respecto al resto de los agonistas con PPAR- γ .
6. Los residuos conservados en el brazo I de los PPARs son imprescindibles para la unión con el ligando.
7. La activación de PPAR- β/δ propicia un ambiente favorable a edades tempranas en el modelo R6/1

9. Referencias

- Aleshin, S., Strokin, M., Sergeeva, M., & Reiser, G. (2013). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)beta/delta, a possible nexus of PPARalpha- and PPARgamma-dependent molecular pathways in neurodegenerative diseases: Review and novel hypotheses. *Neurochem Int*, *63*, 322–330. <http://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.06.012>
- Ali, S. F., LeBel, C. P., & Bondy, S. C. (1992). Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology*, *13*(3), 637–48. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1475065>
- Almeida, S., Sarmiento-Ribeiro, A. B., Januário, C., Rego, A. C., & Oliveira, C. R. (2008). Evidence of apoptosis and mitochondrial abnormalities in peripheral blood cells of Huntington's disease patients. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *374*(4), 599–603. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.07.009>
- Arenas, J., Campos, Y., Ribacoba, R., Martín, M. A., Rubio, J. C., Ablanedo, P., & Cabello, A. (1998). Complex I Defect in muscle from patients with Huntington's disease. *Annals of Neurology*, *43*(3), 397–400. <http://doi.org/10.1002/ana.410430321>
- Arregui, L., Benítez, J. A., Razgado, L. F., Vergara, P., & Segovia, J. (2011). Adenoviral Astrocyte-Specific Expression of BDNF in the Striata of Mice Transgenic for Huntington's Disease Delays the Onset of the Motor Phenotype. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *31*(8), 1229–1243. <http://doi.org/10.1007/s10571-011-9725-y>
- Bates, G. P., Dorsey, R., Gusella, J. F., Hayden, M. R., Kay, C., Leavitt, B. R., ... Tabrizi, S. J. (2015). Huntington disease. *Nature Reviews Disease Primers*, (April), 15005. <http://doi.org/10.1038/nrdp.2015.5>
- Beal, M. F., Ferrante, R. J., Swartz, K. J., & Kowall, N. W. (1991). Chronic quinolinic acid lesions in rats closely resemble Huntington's disease. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *11*(6), 1649–59. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1710657>
- Beal, M. F., Kowall, N. W., Ellison, D. W., Mazurek, M. F., Swartz, K. J., & Martin, J. B. (1986). Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by

quinolinic acid. *Nature*, 321(6066), 168–171. <http://doi.org/10.1038/321168a0>

Benedetti, E., D'Angelo, B., Cristiano, L., Di Giacomo, E., Fanelli, F., Moreno, S., ... Cimini, A. (2014). Involvement of peroxisome proliferator-activated receptor β/δ (PPAR β/δ) in BDNF signaling during aging and in Alzheimer disease: possible role of 4-hydroxynonenal (4-HNE). *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 13(8), 1335–44. <http://doi.org/10.4161/cc.28295>

Berger, J., & Moller, D. E. (2002). T m a ppar.

Browne, S. E., & Beal, M. F. (2004). The energetics of Huntington's disease. *Neurochemical Research*, 29(3), 531–46. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15038601>

Browne, S. E., Bowling, A. C., Macgarvey, U., Baik, M. J., Berger, S. C., Muquit, M. M. K., ... Beal, M. F. (1997). Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: Selective vulnerability of the basal ganglia. *Annals of Neurology*, 41(5), 646–653. <http://doi.org/10.1002/ana.410410514>

Chaturvedi, R. K., & Beal, M. F. (2008). Mitochondrial approaches for neuroprotection. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1147, 395–412. <http://doi.org/10.1196/annals.1427.027>

Chaturvedi, R. K., & Beal, M. F. (2013). Mitochondrial diseases of the brain. *Free Radical Biology and Medicine*, 63, 1–29. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.018>

Chiang, M. C., Chern, Y., & Huang, R. N. (2012). PPARgamma rescue of the mitochondrial dysfunction in Huntington's disease. *Neurobiology of Disease*, 45(1), 322–328. <http://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.08.016>

Chiang, M., Chen, C., & Lee, M. (2010). Modulation of energy deficiency in Huntington's disease via activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Human Molecular ...*, 19(20), 4043–58. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddq322>

Costa, V., & Scorrano, L. (2012). Shaping the role of mitochondria in the pathogenesis of Huntington's disease. *The EMBO Journal*, 31(8), 1853–1864. <http://doi.org/10.1038/emboj.2012.65>

Cowell, R. M., Blake, K. R., & Russell, J. W. (2007). Localization of the transcriptional

- coactivator PGC-1 α to GABAergic neurons during maturation of the rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 502(1), 1–18. <http://doi.org/10.1002/cne.21211>
- Coyle, J. T., & Schwarcz, R. (1976). Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature*, 263(5574), 244–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8731>
- D'Agostino, G., Cristiano, C., Lyons, D. J., Citraro, R., Russo, E., Avagliano, C., ... Calignano, A. (2015). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha plays a crucial role in behavioral repetition and cognitive flexibility in mice. *Molecular Metabolism*, 4(7), 528–536. <http://doi.org/10.1016/j.molmet.2015.04.005>
- Damiano, M., Diguët, E., Malgorn, C., D'Aurelio, M., Galvan, L., Petit, F., ... Brouillet, E. (2013). A role of mitochondrial complex II defects in genetic models of Huntington's disease expressing N-terminal fragments of mutant huntingtin. *Human Molecular Genetics*, 22(19), 3869–82. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddt242>
- DeLong, M. R. (1990). Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends in Neurosciences*, 13(7), 281–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1695404>
- Dickey, A. S., Pineda, V. V., Tsunemi, T., Liu, P. P., Miranda, H. C., Gilmore-Hall, S. K., ... La Spada, A. R. (2016). PPAR- δ is repressed in Huntington's disease, is required for normal neuronal function and can be targeted therapeutically. *Nature Medicine*, 22(1), 37–45. <http://doi.org/10.1038/nm.4003>
- Ehrmann, J., & Vavrusova, N. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in health and disease. *BIOMEDICAL PAPERS- ...*, 146(2), 11–4. Retrieved from http://publib.upol.cz/~obd/fulltext/Biomedic146-2/LF11_2002-2.pdf
- Evans, R. M., Barish, G. D., & Wang, Y.-X. (2004). PPARs and the complex journey to obesity. *Nature Medicine*, 10(4), 355–361. <http://doi.org/10.1038/nm1025>
- Fernández-Gómez, F. J., Hernández, F., Argandoña, L., Galindo, M. F., Segura, T., & Jordán, J. (2008). Farmacología de la neuroprotección en el ictus isquémico agudo. *Revista de Neurología*, 47(5), 253–260.
- Ferrante, R. J. (2009). Mouse models of Huntington's disease and methodological

- considerations for therapeutic trials. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1792(6), 506–520. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.04.001>
- Ferrante, R. J., Kowall, N. W., Cipolloni, P. B., Storey, E., & Beal, M. F. (1993). Excitotoxin Lesions in Primates as a Model for Huntington's Disease: Histopathologic and Neurochemical Characterization. *Experimental Neurology*, 119(1), 46–71. <http://doi.org/10.1006/exnr.1993.1006>
- Franklin, K. B. J., & Paxinos, G. (n.d.). *Paxinos and Franklin's The mouse brain in stereotaxic coordinates*.
- Fuenzalida, K., Quintanilla, R., & Ramos, P. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor γ up-regulates the Bcl-2 anti-apoptotic protein in neurons and induces mitochondrial stabilization and protection against. *Journal of Biological Chemistry*, 282(51), 37006–15. <http://doi.org/10.1074/jbc.M700447200>
- Gani, O. a B. S. M., & Sylte, I. (2008). Molecular recognition of docosahexaenoic acid by peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid-X receptor alpha. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 27(2), 217–24. <http://doi.org/10.1016/j.jmgm.2008.04.008>
- Goebel, H. H., Heipertz, R., Scholz, W., Iqbal, K., & Tellez-Nagel, I. (1978). Juvenile Huntington chorea: clinical, ultrastructural, and biochemical studies. *Neurology*, 28(1), 23–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/145549>
- Grafton, S. T., Mazziotta, J. C., Pahl, J. J., St George-Hyslop, P., Haines, J. L., Gusella, J., ... Phelps, M. E. (1992). Serial changes of cerebral glucose metabolism and caudate size in persons at risk for Huntington's disease. *Archives of Neurology*, 49(11), 1161–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1444883>
- Gu, M., Gash, M. T., Mann, V. M., Javoy-Agid, F., Cooper, J. M., & Schapira, A. H. V. (1996). Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Annals of Neurology*, 39(3), 385–389. <http://doi.org/10.1002/ana.410390317>
- Guedes, I. A., de Magalhães, C. S., & Dardenne, L. E. (2014). Receptor-ligand molecular docking. *Biophysical Reviews*, 6(1), 75–87. <http://doi.org/10.1007/s12551-013-0130-2>
- Hargreaves, K. M., & Pardridge, W. M. (1988). Neutral amino acid transport at the human

- blood-brain barrier. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(36), 19392–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2848825>
- Heneka, M. T., & Landreth, G. E. (2007). PPARs in the brain. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771(8), 1031–45. <http://doi.org/10.1016/j.bbalip.2007.04.016>
- Hodges, A., Hughes, G., Brooks, S., Elliston, L., Holmans, P., Dunnett, S. B., & Jones, L. (2008). Brain gene expression correlates with changes in behavior in the R6/1 mouse model of Huntington's disease. *Genes, Brain and Behavior*, 7(3), 288–299. <http://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2007.00350.x>
- Hwang, J., Chang, Y.-H., Park, J., Kim, S., Chung, H., Shim, E., & Hwang, H. (2011). Dietary saturated and monounsaturated fats protect against acute acetaminophen hepatotoxicity by altering fatty acid composition of liver microsomal membrane in rats. *Lipids in Health and Disease*, 10(1), 184. <http://doi.org/10.1186/1476-511X-10-184>
- Iwashita, A., & Muramatsu, Y. (2007). Neuroprotective efficacy of the peroxisome proliferator-activated receptor δ -selective agonists in vitro and in vivo. ... of *Pharmacology and ...*, 320(3), 1087–1096. <http://doi.org/10.1124/jpet.106.115758.al>
- Jain, A. N., & Nicholls, A. (2008). Recommendations for evaluation of computational methods. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 22(3–4), 133–9. <http://doi.org/10.1007/s10822-008-9196-5>
- Jenkins, B. G., Rosas, H. D., Chen, Y. C., Makabe, T., Myers, R., MacDonald, M., ... Koroshetz, W. J. (1998). ¹H NMR spectroscopy studies of Huntington's disease: correlations with CAG repeat numbers. *Neurology*, 50(5), 1357–65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9595987>
- Jin, J., Albertz, J., Guo, Z., Peng, Q., Rudow, G., Troncoso, J. C., ... Duan, W. (2013). Neuroprotective effects of PPAR- γ agonist rosiglitazone in N171-82Q mouse model of Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry*, 125(3), 410–9. <http://doi.org/10.1111/jnc.12190>
- Jung, T. W., Lee, J. Y., Shim, W. S., Kang, E. S., Kim, S. K., Ahn, C. W., ... Cha, B. S. (2007). Rosiglitazone protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against MPP+ induced cytotoxicity via inhibition of mitochondrial dysfunction and ROS production. *Journal of the Neurological Sciences*, 253(1–2), 53–60.

<http://doi.org/10.1016/j.jns.2006.11.020>

- Kariharan, T., Nanayakkara, G., Parameshwaran, K., Bagasrawala, I., Ahuja, M., Abdel-Rahman, E., ... Amin, R. H. (2015). Central activation of PPAR-gamma ameliorates diabetes induced cognitive dysfunction and improves BDNF expression. *Neurobiology of Aging*, 36(3), 1451–1461. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.09.028>
- Kaundal, R. K., & Sharma, S. S. (2011). GW1929: A nonthiazolidinedione PPAR γ agonist, ameliorates neurological damage in global cerebral ischemic-reperfusion injury through reduction in inflammation and DNA fragmentation. *Behavioural Brain Research*, 216(2), 606–612. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.09.001>
- Khan, M. Z., & He, L. (2017). The role of polyunsaturated fatty acids and GPR40 receptor in brain. *Neuropharmacology*, 113, 639–651. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.05.013>
- Kolb, P., & Irwin, J. J. (2009). Docking screens: right for the right reasons? *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 9(9), 755–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19754393>
- Kuwert, T., Lange, H. W., Boecker, H., Titz, H., Herzog, H., Aulich, A., ... Feineisen, L. E. (1993). Striatal glucose consumption in chorea-free subjects at risk of Huntington's disease. *Journal of Neurology*, 241(1), 31–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8138819>
- Lin, J., Handschin, C., & Spiegelman, B. M. (2005). Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metabolism*, 1(6), 361–70. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.05.004>
- Ma, Y., Wang, S.-Q., Xu, W.-R., Wang, R.-L., & Chou, K.-C. (2012). Design novel dual agonists for treating type-2 diabetes by targeting peroxisome proliferator-activated receptors with core hopping approach. *PloS One*, 7(6), e38546. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0038546>
- Madrigal, J. L. M., Kalinin, S., Richardson, J. C., & Feinstein, D. L. (2007). Neuroprotective actions of noradrenaline: effects on glutathione synthesis and activation of peroxisome proliferator activated receptor delta. *Journal of Neurochemistry*, 103(5), 2092–101. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04888.x>

- Marion-Letellier, R., Savoye, G., & Ghosh, S. (2016). Fatty acids, eicosanoids and PPAR gamma. *European Journal of Pharmacology*, 785, 44–49.
<http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.11.004>
- Martínez-lazcano, J. C., Boll-woehrlen, M. C., Paz, M. De, Hernández-melesio, A., Rubio-osornio, M., Sánchez-, M. A., ... Pérez-severiano, F. (2010). RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO EN LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS, XXXIV, 43–59.
- McBride, J. L., During, M. J., Wu, J., Chen, E. Y., Leurgans, S. E., & Kordower, J. H. (2003). Structural and functional neuroprotection in a rat model of Huntington's disease by viral gene transfer of GDNF. *Experimental Neurology*, 181(2), 213–23.
Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12781994>
- Medhi, B., Aggarwal, R., & Chakrabarti, A. (2010). Neuroprotective effect of pioglitazone on acute phase changes induced by partial global cerebral ischemia in mice. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48(8), 793–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21341537>
- Michalik, L., & Wahli, W. (2006). Review series Involvement of PPAR nuclear receptors in tissue injury and wound repair, 116(3). <http://doi.org/10.1172/JCI27958.598>
- Miglio, G., Rosa, A. C., Rattazzi, L., Collino, M., Lombardi, G., & Fantozzi, R. (2009). PPARgamma stimulation promotes mitochondrial biogenesis and prevents glucose deprivation-induced neuronal cell loss. *Neurochemistry International*, 55(7), 496–504.
<http://doi.org/10.1016/j.neuint.2009.05.001>
- Miller, B. R., & Bezprozvanny, I. (2010). Corticostriatal circuit dysfunction in Huntington's disease: intersection of glutamate, dopamine and calcium. *Future Neurology*, 5(5), 735–756. <http://doi.org/10.2217/fnl.10.41>
- Mochel, F., & Haller, R. G. (2011). Energy deficit in Huntington disease: why it matters. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(2), 493–9. <http://doi.org/10.1172/JCI45691>
- Morales-Martínez, A., Sánchez-Mendoza, A., Martínez-Lazcano, J. C., Pineda-Farías, J. B., Montes, S., El-Hafidi, M., ... Pérez-Severiano, F. (2016). Essential fatty acid-rich diets protect against striatal oxidative damage induced by quinolinic acid in rats. *Nutritional Neuroscience*, 8305(March), 16022905557004.

<http://doi.org/10.1080/1028415X.2016.1147683>

Panov, A. V., Gutekunst, C.-A., Leavitt, B. R., Hayden, M. R., Burke, J. R., Strittmatter, W. J., & Greenamyre, J. T. (2002). Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nature Neuroscience*, *5*(8), 731–6.

<http://doi.org/10.1038/nn884>

Pérez-Neri, I., Castro, E., Montes, S., Boll, M.-C., Barges-Coll, J., Soto-Hernández, J. L., & Ríos, C. (2007). Arginine, citrulline and nitrate concentrations in the cerebrospinal fluid from patients with acute hydrocephalus. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *851*(1–2), 250–6.

<http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.10.047>

Pérez-Severiano, F., Ríos, C., & Segovia, J. (2000). Striatal oxidative damage parallels the expression of a neurological phenotype in mice transgenic for the mutation of Huntington's disease. *Brain Research*, *862*(1), 234–237.

[http://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02082-5](http://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02082-5)

Purves, D., & Williams, S. M. (Stephen M. (2001). *Neuroscience*. Sinauer Associates.

Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10799/>

Rios, C., & Santamaria, A. (1991). Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. *Neurochemical Research*, *16*(10), 1139–43. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1686636>

Roberts, R. C., Ahn, A., Swartz, K. J., Beal, M. F., & DiFiglia, M. (1993). Intrastratial Injections of Quinolinic Acid or Kainic Acid: Differential Patterns of Cell Survival and the Effects of Data Analysis on Outcome. *Experimental Neurology*, *124*(2), 274–282.

<http://doi.org/10.1006/exnr.1993.1197>

Sánchez-Huertas, C., & Rico, B. (2011). CREB-dependent regulation of *gad65* transcription by BDNF/TrkB in cortical interneurons. *Cerebral Cortex*, *21*(4), 777–788.

<http://doi.org/10.1093/cercor/bhq150>

Saudou, F., & Humbert, S. (2016). The Biology of Huntingtin. *Neuron*, *89*(5), 910–926.

<http://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.02.003>

Scarpulla, R. C. (2002). Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial

- biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1576(1–2), 1–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12031478>
- Schwarcz, R., Hökfelt, T., Fuxe, K., Jonsson, G., Goldstein, M., & Terenius, L. (1979). Ibotenic acid-induced neuronal degeneration: a morphological and neurochemical study. *Experimental Brain Research*, 37(2), 199–216. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/40808>
- Schwarcz, R., & Köhler, C. (1983). Differential vulnerability of central neurons of the rat to quinolinic acid. *Neuroscience Letters*, 38(1), 85–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6225037>
- Serghides, L., McDonald, C. R., Lu, Z., Friedel, M., Cui, C., Ho, K. T., ... Kain, K. C. (2014). PPAR γ Agonists Improve Survival and Neurocognitive Outcomes in Experimental Cerebral Malaria and Induce Neuroprotective Pathways in Human Malaria. *PLoS Pathogens*, 10(3), e1003980. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003980>
- Squitieri, F., Cannella, M., Sgarbi, G., Maglione, V., Falleni, A., Lenzi, P., ... Fornai, F. (2006). Severe ultrastructural mitochondrial changes in lymphoblasts homozygous for Huntington disease mutation. *Mechanisms of Ageing and Development*, 127(2), 217–220. <http://doi.org/10.1016/j.mad.2005.09.010>
- Staels, B., Dallongeville, J., Auwerx, J., Schoonjans, K., Leitersdorf, E., & Fruchart, J.-C. (1998). Mechanism of Action of Fibrates on Lipid and Lipoprotein Metabolism. *Circulation*, 98(19), 2088–2093. <http://doi.org/10.1161/01.CIR.98.19.2088>
- Suzuki, M., Noda, K., Kubota, S., Hirasawa, M., Ozawa, Y., Tsubota, K., ... Ishida, S. (2010). Eicosapentaenoic acid suppresses ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis. *Molecular Vision*, 16(July), 1382–8. <http://doi.org/152> [pii]
- Tabrizi, S. J., Cleeter, M. W., Xuereb, J., Taanman, J. W., Cooper, J. M., & Schapira, A. H. (1999). Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain. *Annals of Neurology*, 45(1), 25–32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9894873>
- Tenenbaum, A., & Fisman, E. (2012). Balanced pan-PPAR activator bezafibrate in combination with statin: comprehensive lipids control and diabetes prevention.

- Cardiovasc Diabetol*, 11(1), 140. <http://doi.org/10.1186/1475-2840-11-140>
- Trott, O., & Olson, A. J. (2009). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), NA-NA. <http://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Turner, C., & Schapira, A. H. V. (2010). Mitochondrial matters of the brain: the role in Huntington's disease. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 42(3), 193–198. <http://doi.org/10.1007/s10863-010-9290-y>
- Tyagi, S., Gupta, P., & Saini, A. (2011). The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *Journal of Advanced ...*, 2(4), 236–40. <http://doi.org/10.4103/2231-4040.90879>
- Vallée, A., & Lecarpentier, Y. (2016). Alzheimer Disease: Crosstalk between the Canonical Wnt/Beta-Catenin Pathway and PPARs Alpha and Gamma. *Frontiers in Neuroscience*, 10, 459. <http://doi.org/10.3389/fnins.2016.00459>
- Vazey, E. M., Chen, K., Hughes, S. M., & Connor, B. (2006). Transplanted adult neural progenitor cells survive, differentiate and reduce motor function impairment in a rodent model of Huntington's disease. *Experimental Neurology*, 199(2), 384–396. <http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.01.034>
- Viswakarma, N., Jia, Y., & Bai, L. (2010). Coactivators in PPAR-regulated gene expression. *PPAR Research*, 2010. <http://doi.org/10.1155/2010/250126>
- Yu, S., Mulley, J., Loesch, D., Turner, G., Donnelly, A., Gedeon, A., ... Harper, P. S. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell*, 72(6), 971–83. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90585-E](http://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90585-E)
- Zhao, Y., Patzer, A., Herdegen, T., Gohlke, P., & Culman, J. (2006). Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma promotes neuroprotection by attenuation of neuronal cyclooxygenase-2 overexpression after focal cerebral ischemia in rats. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(8), 1162–75. <http://doi.org/10.1096/fj.05-5007com>

Zheng, Z., & Diamond, M. I. (2012). Huntington Disease and the Huntingtin Protein. In *Progress in molecular biology and translational science* (Vol. 107, pp. 189–214). <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-385883-2.00010-2>

Zoete, V., Grosdidier, A., & Michielin, O. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor structures: ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771(8), 915–925. <http://doi.org/10.1016/j.bbailip.2007.01.007>

Zuccato, C., & Cattaneo, E. (2007). Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. *Progress in Neurobiology*, 81(5–6), 294–330. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.01.003>

Producto

Essential fatty acid-rich diets protect against striatal oxidative damage induced by quinolinic acid in rats

Adriana Morales-Martínez^{1,2}, Alicia Sánchez-Mendoza³, Juan Carlos Martínez-Lazcano⁴, Jorge Baruch Pineda-Farías¹, Sergio Montes¹, Mohammed El-Hafidi⁵, Pablo Elías Martínez-Gopar¹, Luis Tristán-López¹, Iván Pérez-Neri¹, Absalom Zamorano-Carrillo², Nelly Castro⁶, Camilo Ríos¹, Francisca Pérez-Severiano¹

¹Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez", Insurgentes Sur #3877, Col. La Fama, Tlalpan, 14269 México D.F., México, ²Laboratorio de Investigación de Bioquímica y Biofísica Computacional, Escuela Nacional de Medicina y de Homeopatía del IPN, Guillermo Massieu H. #239. La Escalera, Gustavo A. Madero, 07320 México D.F., México, ³Departamento de Farmacología, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", Juan Badiano #1, Col. Sección XVI, Tlalpan, México D.F., México, ⁴Departamento de Neurofisiología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez", Insurgentes Sur #3877, Col. La Fama, Tlalpan, 14269 México D.F., México, ⁵Departamento de Biomedicina Cardiovascular, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", Juan Badiano 1, Col. Sección XVI, Tlalpan, México D.F., México, ⁶Laboratorio de Neuropsicofarmacología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Insurgentes sur 3877, La Fama, Tlalpan, 14269 México D.F., México

Essential fatty acids have an important effect on oxidative stress-related diseases. The Huntington's disease (HD) is a hereditary neurologic disorder in which oxidative stress caused by free radicals is an important damage mechanism. The HD experimental model induced by quinolinic acid (QUIN) has been widely used to evaluate therapeutic effects of antioxidant compounds. The aim of this study was to test whether the fatty acid content in olive- or fish-oil-rich diet prevents against QUIN-related oxidative damage in rats. Rats were fed during 20 days with an olive- or a fish-oil-rich diet (15% w/w). Posterior to diet period, rats were striatally microinjected with QUIN (240 nmol/ μ l) or saline solution. Then, we evaluated the neurological damage, oxidative status, and gamma isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR γ) expression. Results showed that fatty acid-rich diet, mainly by fish oil, reduced circling behavior, prevented the fall in GABA levels, increased PPAR γ expression, and prevented oxidative damage in striatal tissue. In addition none of the enriched diets exerted changes neither on triglycerides or cholesterol blood levels, nor on hepatic function. This study suggests that olive- and fish-oil-rich diets exert neuroprotective effects.

Keywords: Essential fatty acids, Olive oil, Fish oil, Oxidative damage, Huntington's disease